

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**“ESTUDIO DE FACTORES PRONÓSTICOS EN LOS ESTADIOS  
PRECOCES DE CÁNCER ORAL. IMPORTANCIA DE LA  
LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL Y DEL FACTOR  
INDUCIBLE POR HIPOXIA 1-ALPHA (HIF 1- $\alpha$ )”**

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Doctorando: **Ana-Laura Capote Moreno**

Tutor: **Prof. Dr. D. José Cordero Ampuero**

Directores: **Prof. Dr. D. Carlos Gamallo Amat**

**Dr. D. Mario F. Muñoz Guerra**



*A mi hija Elisa  
que me da tantas alegrías  
y a mi hija Sofía  
que está a punto de llegar*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Profesor Carlos Gamallo Amat y al Dr. Mario Muñoz Guerra por su dedicación e insistencia, porque sin ellos nunca habría sido posible realizar y terminar este trabajo. Ellos me han dado los medios, la ilusión y me han enseñado con sus conocimientos a lo largo de estos años todo lo que he podido mostrar en estas páginas.

Al Dr. Díaz González, al Dr. Gil Díez, al Dr. Naval y al Dr. Rodríguez Campo por su formación durante mis años de residencia y también durante mis primeros años de médico adjunto de los que sigo aprendiendo tantas cosas. En especial quiero agradecer a Luis Naval y a Paco Rodríguez porque gracias a su esfuerzo tenemos las bases de datos de oncología que han servido para la realización de este trabajo y de otras muchas publicaciones.

A mis compañeros, Jesús, Verónica, Pilar y a todos los residentes del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del hospital de La Princesa, por su compañerismo, su amistad y su ayuda en los momentos difíciles.

A la Dra. María Encarnación Fernández-Contreras por su dedicación a lo largo de estos años y por sus consejos y a los técnicos de laboratorio por excelente trabajo en el manejo de las muestras y en el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica y PCR, sin los que este trabajo no hubiera sido posible.

Al personal del Archivo de historias clínicas del Hospital de la Princesa y a Gloria, nuestra bibliotecaria, por su colaboración en la búsqueda de las historias clínicas y del material bibliográfico, imprescindibles para este trabajo.

A mis padres Juan y Ana, mi hermano Juan, mis suegros Luis y Carmen Rosa, a Teye, Sebas, Paula y Luis, por ser como son, por su apoyo, su cariño y por los buenos ratos que pasamos juntos.

A mi marido Rafa, porque es el que me ha soportado durante la realización de este trabajo, me ha aconsejado a lo largo de estos mis primeros años de profesión y porque está siempre a mi lado, incondicional y por muchos años.

## ÍNDICE





1. RESUMEN .....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	11
2.1 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO .....	13
2.1.1. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL .....	14
2.1.2. FACTORES DE RIESGO CLINICO-PATOLÓGICOS .....	18
2.2. ESTADIOS PRECOCES DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE INTRAORAL.....	24
2.3. LINFANGIOGÉNESIS Y PROGRESIÓN TUMORAL .....	27
2.3.1. MECANISMOS DE DISEMINACIÓN TUMORAL .....	27
2.3.2. FORMACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO .....	29
2.3.3. LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL.....	31
2.3.4. MARCADORES DE LINFANGIOGÉNESIS .....	32
2.3.5. VEGF-C COMO FACTOR LINFANGIOGÉNICO.....	38
2.4. HIPOXIA Y FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA HIF-1 $\alpha$ .....	41
2.4.1. HIPOXIA TUMORAL .....	41
2.4.2. HIF-1 $\alpha$ .....	43
2.4.2.1. HIF-1 $\alpha$ Y CÁNCER ORAL .....	46
2.4.2.1.1. Angiogénesis y VEGF .....	47
2.4.2.1.2. Glicólisis anaerobia .....	48
2.4.2.1.3. Inhibición de la apoptosis o inmortalización .....	49
2.4.2.2. POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$ .....	49
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
3.1. ANTECEDENTES AL ESTUDIO .....	57
3.2. HIPÓTESIS .....	58
3.3. OBJETIVOS .....	59
4. PACIENTES Y MÉTODO .....	61
4.1. PACIENTES.....	63
4.1.1. MUESTRA DE ESTUDIO .....	63
4.1.2. BASE DE DATOS .....	67
4.1.3. VARIABLES CLINICO-PATOLÓGICAS .....	68
4.1.4. MUESTRAS HISTOLÓGICAS.....	69
4.2. MÉTODO .....	70
4.2.1. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL.....	70
4.2.2. LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL.....	74

4.2.2.1. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	74
4.2.2.2. EVALUACIÓN DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL..	75
4.2.3. POLIMORFISMO DE HIF-1 $\alpha$ .....	79
4.2.3.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL ADN.....	80
4.2.3.2. AMPLIFICACIÓN CON PCR.....	80
4.2.3.3. RFLP .....	81
4.2.3.4. EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO .....	82
4.2.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.....	86
4.2.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	86
4.2.4.2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA .....	87
5. RESULTADOS .....	91
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	93
5.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICO- PATOLÓGICAS .....	93
5.1.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CLASIFICACIÓN DE ANNEROTH .....	99
5.1.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL.....	101
5.1.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL POLIMORFISMO DE HIF-1 $\alpha$ .....	102
5.2. ANÁLISIS COMPARATIVO.....	103
5.2.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES VARIABLES CLÍNICO- PATOLÓGICAS .....	103
5.2.1.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA .....	103
5.2.1.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL, SUPERVIVENCIA CAUSA- ESPECÍFICA Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN LA SERIE GLOBAL .....	108
5.2.1.3. SUPERVIVENCIA EN LOS GRUPOS I Y II .....	109
5.2.2. ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE ANNEROTH .....	110
5.2.3. ANÁLISIS DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL .....	112
5.2.4. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$ .....	118
5.2.4.1. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ ENTRE VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES.....	118
5.2.4.2. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ Y SUPERVIVENCIA.....	119

5.2.4.3. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ CON OTRAS VARIABLES .....	122
5.3. ANÁLISIS EN EL GRUPO DE SEGUNDAS NEOPLASIAS .....	124
5.3.1. ANALISIS DESCRIPTIVO .....	124
5.3.2. ANÁLISIS COMPARATIVO.....	127
6. DISCUSIÓN .....	129
6.1. ESTADIOS PRECOCES Y METÁSTASIS GANGLIONARES .....	131
6.2. LINFANGIOGENESIS INTRATUMORAL.....	135
6.3. POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$ .....	140
6.4. SEGUNDAS NEOPLASIAS .....	146
7. CONCLUSIONES.....	151
8. BIBLIOGRAFÍA.....	155



## **RESUMEN**



## **INTRODUCCIÓN**

Los estadios precoces del carcinoma epidermoide de cavidad oral y orofaringe presentan un porcentaje no desdeñable de recidivas loco-regionales que ensombrecen el pronóstico de estos tumores pequeños menores de 4 cm. teóricamente curables con el tratamiento del tumor primario. Determinar los factores que predisponen a estas recidivas y empeoran el pronóstico es objeto de este trabajo. El sistema linfático es la principal vía de diseminación de las células tumorales en el CEI. El conocimiento de marcadores específicos para los vasos linfáticos ha permitido estudiar los procesos de linfangiogénesis que subyacen en el estroma tumoral y su influencia en estas metástasis. Así mismo, los estudios más recientes se centran en la acción de factor HIF-1 $\alpha$  en el cáncer intraoral. Los polimorfismos de este factor parecen conferir una cierta susceptibilidad al cáncer y pueden influir en la evolución de la enfermedad.

## **PACIENTES Y MÉTODO**

Se realiza un estudio retrospectivo de 124 pacientes con CEI en estadios precoces (tumores menores de 4 cm.), de los cuales 81 pacientes han sido sometidos a una disección de los ganglios linfáticos cervicales que confirma el estado pN0 del cuello y 43 pacientes en los cuales no ha sido necesaria dicha disección (N0 clínico). Se analiza mediante técnicas de inmunohistoquímica con el marcador PA2.26 la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales en las muestras tumorales. Mediante técnicas de PCR-RFLP se identifica la presencia de los polimorfismos C1772T y G1790A en los pacientes y una muestra de voluntarios sanos. Mediante el estudio estadístico se determina la

influencia de la linfangiogénesis intratumoral y de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  en el pronóstico de la serie.

## **RESULTADOS**

En el grupo de pacientes con disección cervical, la presencia de vasos linfáticos intratumorales se asocia a un mayor índice de recidivas loco-regionales (24,5% de recidivas en el grupo LF+ frente a 6,7% en el grupo LF-;  $p=0,03$ ). Respecto al polimorfismo G1790A de HIF 1- $\alpha$ , se detecta el alelo polimórfico A con mayor frecuencia en el grupo de pacientes (38,1%) que en los voluntarios sanos (6,5%) ( $p<0,01$ ). Así mismo, este polimorfismo se asocia con un mayor riesgo de recidivas en el grupo de pacientes con CEI (48% de recidivas para el alelo A frente a 21,1% para G/G;  $p=0,02$ ). C1772T no mostró una mayor frecuencia en el grupo de pacientes frente a la población sana ni se asoció con un mayor riesgo de recidivas.

## **CONCLUSIONES**

En los estadios precoces del CEI, la linfangiogénesis intratumoral y el polimorfismo G1790A parecen actuar como factores pronósticos en la evolución de la enfermedad. La presencia del alelo A parece conferir cierta susceptibilidad para este tipo de tumores.



## **INTRODUCCIÓN**



## 2.1 ETIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El carcinoma epidermoide representa el tumor maligno primario por excelencia de la cavidad oral y la orofaringe, constituyendo en esta localización más de un 50% de todos los carcinomas de cabeza y cuello. Dicho tumor es la quinta neoplasia maligna más frecuente en los varones de países desarrollados y la sexta en las mujeres. Según estadísticas tomadas de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) 2003, en la Unión Europea se produjeron 55.600 nuevos casos de cáncer oral, falleciendo por esta causa un total de 19.930 pacientes.<sup>1</sup> Estadísticas de los años 1993 y 1996 muestran en España una incidencia global de cáncer oral que oscila entre 5,7 y 12,9 casos/ 100.000 habitantes/ año, mientras que en la comunidad de Madrid esta incidencia es de 7,8 casos/ 100.000 habitantes/ año.<sup>2</sup> La supervivencia global de estos tumores varía según los diversos estudios publicados entre un 37-55% a 5 años.<sup>3-6</sup> Las tasas globales de mortalidad por carcinoma epidermoide intraoral (CEI) han ido aumentando progresivamente en las últimas décadas, a pesar del mejor conocimiento de los factores de riesgo que intervienen en el mismo y de los avances terapéuticos actuales. En España se ha observado un incremento anual de dichas tasas de mortalidad en asociación con el sexo, de modo que en los últimos estudios epidemiológicos se ha identificado un incremento anual del 25% en varones frente al 9% observado en mujeres.<sup>7</sup>

### 2.1.1. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER ORAL

Se han descrito diferentes factores etiológicos de riesgo relacionados con el desarrollo y la evolución del CEI, con resultados diversos en cuanto a su significación y a su valor pronóstico. El término CEI hace referencia a todos aquellos carcinomas que se desarrollan en la mucosa oral y orofaríngea, excluyendo, por tanto a aquellos tumores localizados en el labio.<sup>4,8</sup> Factores epidemiológicos como la *edad*, el *sexo* y la *raza* han sido relacionados clásicamente con el cáncer oral. La edad característica de presentación del CEI está representada por la 6ª y 7ª décadas de la vida. Sin embargo, puede desarrollarse en adultos jóvenes menores de 40 años. Ciertas publicaciones han sugerido que la aparición de este tipo de tumores en gente joven se caracteriza por una mayor agresividad biológica con el consiguiente mal pronóstico del paciente. Las bases biológicas que subyacen en los procesos de carcinogénesis deben diferir en el grupo de pacientes menores de 40 años respecto a los adultos mayores para poder justificar el diferente comportamiento tumoral y esta agresividad.<sup>9,10</sup> Por el contrario, otros autores han demostrado la ausencia de diferencias significativas tanto en los factores de riesgo como la evolución de estos pacientes.<sup>11-13</sup> En cuanto al género, esta patología predomina en el sexo masculino con una relación varón-mujer del 2:1 a 8:1 según las distintas series.<sup>6,12,14</sup> El sexo femenino parece ser un factor protector en el pronóstico del carcinoma de cabeza y cuello, ya que las tasas de supervivencia objetivadas según las diferentes publicaciones son más elevadas respecto a los varones, con un riesgo de fallecer por cáncer oral 1,54 veces mayor en este grupo frente a las mujeres.<sup>3,6,15-17</sup> El sexo masculino presenta una tendencia al diagnóstico de tumores en estadios más avanzados,

lo cual empeora el pronóstico.<sup>15</sup> Sin embargo, existe una cierta tendencia en los últimos años a igualarse estas tasas de supervivencia en relación con el sexo.<sup>1</sup> La raza negra se correlaciona con la presencia de tumores en estadios avanzados en el momento del diagnóstico y con un peor pronóstico de supervivencia.<sup>15</sup>

El consumo de *tabaco* y *alcohol* son dos de los principales factores etiológicos clásicamente asociados al CEI, incluso los efectos parecen potenciarse si aparecen los dos hábitos en un mismo paciente.<sup>1,2,14,17-22</sup> En España, un 36% de la población mayor de 15 años es fumadora de forma habitual. En un estudio realizado en la comunidad de Madrid, se observó que el riesgo relativo para desarrollar un carcinoma intraoral en una persona fumadora era cinco veces mayor que en una no fumadora (Odds ratio (OR) de 5,03) y este riesgo aumentaba con la dosis de consumo (OR= 12,57 si el consumo es mayor de 20 cigarrillos/día). Adicionalmente, el riesgo relativo para una persona bebedora era dependiente de la cantidad diaria de alcohol que se consuma, con una OR de 6,76 para aquellos bebedores de más de 50 gramos/día.<sup>2</sup> Clásicamente se han identificado estos dos hábitos tóxicos en el grupo de pacientes varones. Sin embargo, se observa una tendencia al aumento de fumadores y bebedores entre las mujeres lo que explica el incremento de la incidencia del CEI en este grupo.<sup>1</sup> Además de considerarse factores de riesgo para padecer un cáncer oral, autores como *Bundgaard y cols* han identificado el valor pronóstico de estos dos hábitos como factores predictivos de supervivencia.<sup>3</sup> El consumo de otras sustancias como el *Betel* o el *Maté* en

determinadas culturas, ha sido relacionado con un aumento del riesgo de desarrollar un CEI.<sup>23-25</sup>

Se ha estudiado la relación etiológica de diversas infecciones con el desarrollo de lesiones premalignas y con el CEI, como las infecciones virales por el *Papilomavirus humano (HPV)*, el *virus Epstein-Barr (EBV)*, el *Herpes virus Simplex o infecciones bacterianas como la sífilis*.<sup>14,26-32</sup> El HPV es el virus que se asocia con mayor frecuencia con el cáncer oral, con una prevalencia entre el 7% al 20% en lesiones malignas para los subtipos oncogénicos de la mucosa oral.<sup>14,26</sup> La presencia de estos subtipos oncogénicos del virus, como el HPV-16 y el HPV-18, ha demostrado una correlación significativa como factor pronóstico independiente en el CEI.<sup>27</sup> En cuanto al EBV, en un estudio realizado por *Sand et al* este virus se detectó de forma significativa en un 26% de pacientes con lesiones de liquen plano y en un 38% de pacientes con CEI, con una *odds ratio* de 6,8 de presentar positividad para EBV en los pacientes con patología oral (liquen plano o CEI) frente a los pacientes con mucosa normal.<sup>28</sup> La sífilis se ha descrito clásicamente como otro factor etiológico ya que interviene en el desarrollo de lesiones sifilíticas orales consideradas como premalignas.<sup>31,32</sup> Estos agentes infecciosos parecen actuar de forma sinérgica en la génesis tumoral junto con otros factores etiológicos como el tabaco o el alcohol.

Otros posibles factores socio-culturales han sido implicados en la etiología del cáncer oral tales como: el *nivel socio-económico*, la *exposición ocupacional*, el *nivel nutricional*, la *dieta*, la *higiene dental*, el *uso de prótesis dentales* o las

*enfermedades hereditarias.*<sup>2,14,16,18,33-35</sup> El nivel socioeconómico bajo ha sido relacionado con un mayor riesgo de padecer cáncer oral, así como la malnutrición que suele ir asociada a este grupo poblacional. Diversas profesiones expuestas a posibles tóxicos carcinogénicos también se han intentado asociar con esta patología como: los trabajadores de la industria del petróleo, metales o textil, los trabajadores de la construcción y de la industria eléctrica, los trabajadores del ferrocarril, los fontaneros, los pintores, los carniceros o los herreros.<sup>14</sup> En relación con la dieta, como en otros tipos de cánceres, el consumo elevado de frutas y verduras, las nueces, el aceite de oliva o el vino tinto en consumo moderado intervienen como protectores del CEI, mientras que el elevado consumo de carne, la comida rápida o los alimentos fritos y con alto contenido en grasa actuarían como factores de riesgo.<sup>16,18,34</sup> Algunos autores han intentado correlacionar el alto consumo de vitaminas y determinados micronutrientes (hierro, magnesio) así como el empleo de suplementos vitamínicos con la prevención del CEI.<sup>34,35</sup> La higiene dental adecuada va a actuar como factor protector del desarrollo de lesiones malignas en la cavidad oral.<sup>2</sup> El traumatismo por prótesis dentales mal ajustadas es un antecedente frecuente en muchos casos de cáncer oral.<sup>16</sup> En cuanto a los factores hereditarios, no existen datos consistentes al respecto en el CEI al contrario que lo observado para otros carcinomas como el colo-rectal, el de mama o el ovárico.<sup>14</sup>

### 2.1.2. FACTORES DE RIESGO CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Si bien los factores etiológicos descritos se han correlacionado con el riesgo de padecer un CEI, otras variables intrínsecas del tumor se han asociado con la evolución de la enfermedad. Diversos factores pronósticos tanto clínicos como anatomopatológicos han sido analizados ampliamente por numerosos estudios con el propósito de individualizar el tratamiento para cada paciente. Estas variables clínicas y patológicas permiten estimar el pronóstico individual de supervivencia y la probabilidad de desarrollar recidivas loco-regionales (*Tabla 1*).

FACTORES CLÍNICOS	FACTORES ANATOMOPATOLÓGICOS
Estadio tumoral Tamaño tumoral Metástasis linfáticas cervicales Lesiones premalignas Localización tumoral	Espesor tumoral Márgenes quirúrgicos Grado de diferenciación Extensión ganglionar extracapsular Invasión tumoral perineural Invasión tumoral vascular Invasión tumoral linfática Modo de invasión Polimorfismo nuclear Número de mitosis celulares Grado de queratinización Angiogénesis Otros factores moleculares

*Tabla 1.* Factores de riesgo clínico-patológicos identificados en el CEI.

El sistema de clasificación para el carcinoma epidermoide, tanto de cabeza y cuello como de otras localizaciones, más extendido en todo el mundo fue establecido por el *American Joint Committee on Cancer* y denominado sistema *TNM*.<sup>36</sup> Es indudable que el *estadio tumoral* constituye un factor pronóstico de supervivencia. Las tasas de mortalidad aumentan para los



tumores avanzados (estadios III y IV de la TNM) por encima del 50% a 5 años, frente a tasas inferiores al 40% para los casos precoces (estadios I y II de la TNM).<sup>3,4</sup> El *tamaño tumoral* (valor T) se correlaciona con las tasas de supervivencia y con el desarrollo de recidivas.<sup>37,38</sup> El carcinoma epidermoide metastatiza preferentemente por vía linfática, de ahí que la presencia de *metástasis cervicales* al diagnóstico (valor N) se considere uno de los principales factores indicadores de mal pronóstico en el cáncer oral disminuyendo las tasas de supervivencia por debajo del 50% a 5 años en los casos N positivos.<sup>39-41</sup> Por ello, el tratamiento precoz de las metástasis regionales se ha convertido en uno de los principales objetivos del tratamiento del CEI. Clásicamente, la decisión de realizar una disección cervical profiláctica o electiva asociada a la resección tumoral en pacientes con cuellos clínicamente negativos se fundamentaba en el tamaño tumoral. En este sentido, pacientes con estadios avanzados (T3 y T4) precisaban de un tratamiento sistemático del cuello quedando en duda la indicación electiva para los tumores pequeños (T1 y T2). Sin embargo, se ha observado en estos tumores pequeños un porcentaje de metástasis cervicales primarias ocultas según las distintas series que oscila entre un 6% a 46%.<sup>17,39,42-45</sup> Un estudio recientemente realizado por nuestro grupo sobre la influencia del tipo de tratamiento cervical primario realizado en estadios precoces (disección cervical electiva frente a “vigilancia y observación” del cuello) ha demostrado un peor pronóstico de supervivencia y recidivas en los pacientes sin disección cervical electiva frente a aquellos con exéresis primaria de los ganglios cervicales.<sup>46</sup> Estos factores nos impulsan a considerar el análisis de otra serie de variables diferentes de la TNM a la hora de clasificar a los pacientes. Dichos factores

podrían detectar los casos de posible peor curso evolutivo incluso en tumores pequeños sin afectación ganglionar clínica y, teóricamente, con enfermedad localizada.

Determinadas alteraciones en el epitelio de la cavidad oral han sido consideradas como preneoplásicas por su posible evolución hacia la malignización en diversas condiciones ambientales. Entre estas alteraciones se encuentra la *leucoplasia oral*, la *eritroplasia*, el *liquen plano mucoso* o la *sífilis oral*. La progresión natural de cualquiera de estas lesiones, si se mantienen otros factores de riesgo como el tabaco y el alcohol, es hacia una displasia epitelial leve-moderada, un carcinoma *in situ* o displasia grave y, finalmente, hacia un carcinoma infiltrante. La leucoplasia oral o “mancha blanca” ha sido ampliamente reconocida como una lesión premaligna ya que puede transformarse en un CEI en un 3,6-17,5% de los pacientes. Su tratamiento quirúrgico precoz disminuye el riesgo de transformación maligna.<sup>47-49</sup> La eritroplasia presenta un riesgo de malignización mayor que la leucoplasia ya que hasta en un 90% de los casos se encuentran focos de carcinoma *in situ* en el diagnóstico histológico.<sup>49</sup> El liquen plano oral afecta entre un 0,5% y un 2,5% de la población general, siendo su etiología de causa desconocida aunque se especula la participación del virus de la hepatitis C en su génesis.<sup>50</sup> El potencial de malignización del liquen plano aunque es bajo oscila entre un 0,5% y un 2% según las diversas series, por lo que se debe realizar un seguimiento periódico en estos pacientes.<sup>49-51</sup>

La *localización* más frecuente del CEI es la lengua móvil y el suelo de boca, seguido por la encía, la orofaringe, la mucosa yugal, la base de lengua y más raramente por el paladar duro y blando. Determinados estudios apoyan el significado pronóstico de la localización del tumor primario, de modo que las lesiones localizadas en la lengua móvil y el suelo de boca muestran una mayor tendencia a las recidivas<sup>3</sup>. En contraposición a esto, otros autores no han identificado una influencia pronóstica de la localización del tumor primario.<sup>37,52,53</sup>

La cirugía se considera hoy en día el tratamiento de elección en el CEI, asociada o no a otras terapias complementarias como la radioterapia y la quimioterapia. Obtener unos *márgenes quirúrgicos* libres de enfermedad tumoral es uno de los principales objetivos de la resección oncológica, asegurando así la exéresis completa de la lesión maligna. El estado de los márgenes quirúrgicos ha demostrado tener una implicación pronóstica en los carcinomas de cabeza y cuello, de modo que la afectación tanto macroscópica como microscópica de los mismos parece aumentar el riesgo de recidivas locales, disminuyendo la supervivencia de los pacientes.<sup>41,54-57</sup> Dada la importancia de esta variable en el curso evolutivo del cáncer oral, el resultado de los márgenes quirúrgicos se considera uno de los factores indicadores de tratamiento coadyuvante a la cirugía.

Otro factor de controversia respecto a su implicación pronóstica es el *espesor tumoral*, el cual parece correlacionarse con el desarrollo de metástasis ganglionares cervicales, así como con una disminución de la supervivencia y

del periodo libre de enfermedad.<sup>52,58-61</sup> Diversas publicaciones apuntan hacia el espesor tumoral como un parámetro pronóstico más fiable que el valor T de la clasificación TNM en la valoración del riesgo de metástasis linfáticas regionales.<sup>58,62-64</sup>

El carcinoma epidermoide puede clasificarse según el *grado de diferenciación* o maduración de las células tumorales. Clásicamente se ha empleado el sistema de gradación establecido por *Broders* en 1926 que distingue entre: carcinomas bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados.<sup>65</sup> Esta variable ha sido empleada como indicador pronóstico en múltiples estudios apreciándose una asociación entre grado de diferenciación y la supervivencia, con un mejor pronóstico para aquellos tumores bien diferenciados.<sup>4,43,52,62,66</sup> Sin embargo, en otras publicaciones se ha objetivado una falta de correlación entre el grado histológico de Broders y el pronóstico del CEI.<sup>60,67,68</sup> En estos resultados pueden influir la heterogeneidad de las células tumorales, diferencia en invasividad y comportamiento metastático. Este sistema de Broders no evalúa factores dependientes de la interrelación entre el tejido tumoral y del huésped, los cuales pueden tener un valor predictivo. Por ello, diferentes autores han descrito otros sistemas multifactoriales de clasificación para valorar el grado de agresividad biológica de los diferentes tumores, teniendo en cuenta diferentes parámetros histológicos según un sistema u otro.<sup>64,69-73</sup> En la *Tabla 2* se describen los diferentes sistemas de clasificación más empleados en el CEI.

<b>JAKOBSSON</b> <i>(Jacobsson et al, 1973)</i>		<b>ANNEROTH</b> <i>(Anneroth et al, 1987)</i>
Morfología tumoral Tendencia a la queratinización Aberraciones nucleares Número de mitosis celulares Patrón de invasión Grado de invasión (profundidad) Invasión vascular Grado de infiltración linfoplasmocitaria		Grado de queratinización Polimorfismo nuclear Número de mitosis Patrón de invasión Grado de invasión (profundidad) Respuesta linfoplasmocitaria
<b>BRYNE (1ª modificación del sistema de Anneroth)</b> <i>(Bryne et al, 1989)</i> (analizado en el frente de invasión tumoral)	<b>BRYNE (2ª modificación del sistema de Anneroth)</b> <i>(Bryne et al, 1992)</i>	<b>WOOLGAR</b> <i>(Woolgar et al, 1995)</i> (Modificación de criterios de puntuación de cada variable respecto al sistema Anneroth)
Grado de queratinización Polimorfismo nuclear Número de mitosis Patrón de invasión Respuesta linfoplasmocitaria	Grado de queratinización Polimorfismo nuclear Patrón de invasión Respuesta linfoplasmocitaria	Grado de queratinización Polimorfismo nuclear Número de mitosis Patrón de invasión Grado de invasión (profundidad) Respuesta linfoplasmocitaria

*Tabla 2.* Diferentes sistemas de clasificación histológica del CEI.

De estos sistemas de clasificación se obtiene un índice, tras la suma de las puntuaciones de cada variable que se compone de diferentes categorías, el cuál puede ser empleado como indicador pronóstico. Todos ellos han demostrado tener un valor predictivo en la evolución de CEI y pueden tener utilidad en la toma de decisiones terapéuticas.<sup>40,64,67,68,74,75</sup>

Otra serie de factores anatomopatológicos han demostrado una correlación con el pronóstico del cáncer oral: la invasión tumoral perineural, el grado de invasión muscular, la extensión ganglionar extracapsular, la afectación ósea tumoral, la infiltración vascular y la infiltración linfática tumoral.<sup>17,41,43,58,59,62,64,76,77</sup> Recientemente los estudios se dirigen al

conocimiento de los factores moleculares que intervienen en la progresión tumoral, como la implicación de las moléculas de adhesión y los factores de crecimiento, o la acción de diversos oncogenes y genes supresores.<sup>40,53,78</sup>

## **2.2. ESTADIOS PRECOCES DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE INTRAORAL**

La agresividad biológica del CEI se ve reflejada por su capacidad de metastatizar a los ganglios linfáticos regionales, incluso desde estadios precoces (estadios I y II). Clásicamente se ha postulado que a mayor tamaño tumoral, mayor riesgo de desarrollar metástasis linfáticas y, por tanto peor índice de supervivencia.<sup>40</sup> Sin embargo, autores como *Bundgaard y cols* han demostrado que un 25% de los tumores T1 de cavidad oral presentan un curso agresivo a lo largo de su evolución y un mal pronóstico.<sup>3</sup> La tasa de metástasis ocultas primarias en estadios I y II oscila entre un 6% y un 46%, dependiendo de las diferentes series.<sup>17,39,42-44</sup> Ante esta tasa elevada de metástasis, numerosos autores han sugerido la indicación de realizar un tratamiento electivo del cuello con disección cervical o radioterapia en los estadios precoces.<sup>3,46,79,</sup>

La presencia de recidivas regionales o cervicales en el periodo de seguimiento es la causa más frecuente de fracaso en el tratamiento para los estadios precoces del CEI.<sup>46,55,80,81</sup> El índice de recidivas cervicales varía entre un 14% a un 48% según los diversos autores.<sup>52,53,82,83</sup> Además, el índice de recidivas locales en estos estadios precoces no es desdeñable suponiendo en torno al 18%.<sup>42,44,55</sup> En estos pacientes con presencia de una recidiva local o

regional, el pronóstico se ensombrece considerablemente con bajas tasas de supervivencia a largo plazo.<sup>39,44,61</sup> De hecho, las tasas de rescate en pacientes con recidivas regionales son menores del 40%, a pesar de tratamientos agresivos con cirugía radical, quimioterapia y radioterapia.<sup>39,42</sup> Estos datos avalan que las decisiones terapéuticas no deben basarse exclusivamente en la clasificación TNM, ya que ésta es insuficiente para identificar el riesgo inherente a cada tumor, siendo necesarios otra serie de factores predictivos que complementen esta clasificación.

Como se ha señalado con anterioridad, diversas variables anatomopatológicas como el espesor tumoral, el estado de los márgenes quirúrgicos o las diferentes clasificaciones histológicas sobre el grado de diferenciación tumoral, han demostrado su valor predictivo y su capacidad para seleccionar los pacientes de alto riesgo.<sup>43,55,60,80</sup> Sin embargo, los criterios de estas variables según los diferentes protocolos son diversos y los resultados de los diferentes estudios son en muchos casos contradictorios. Aún con las nuevas pautas de tratamiento individualizadas para cada paciente, las tasas de mortalidad y de recidivas por CEI siguen siendo elevadas.

Por ello, las líneas de investigación actuales se dirigen a definir los eventos que intervienen en los procesos de progresión y diseminación tumoral para poder establecer nuevas terapias adyuvantes que frenen este comportamiento invasivo que demuestran muchos tumores. Uno de los mecanismos que está siendo analizado con gran interés es el proceso de *angiogénesis* tumoral o neoformación de vasos, junto con los factores

promotores que participan en el mismo.<sup>84</sup> Los tumores no sólo necesitan de la existencia de una microcirculación para su crecimiento sino que también ésta parece intervenir en la diseminación de las células neoplásicas a otros tejidos, promoviendo la aparición de las recidivas tumorales y las metástasis.<sup>85-87</sup> En cuanto a estos procesos de angiogénesis, los últimos estudios se centran en la investigación de los eventos que estimulan esta neoformación de vasos como es la acción de la hipoxia tumoral presente en muchos tumores sólidos y de los factores de hipoxia como el “*Factor Inducible por Hipoxia*” o *HIF*.<sup>88,89</sup> Además de la invasión de los vasos sanguíneos por las células tumorales, el sistema linfático parece jugar un papel activo en el proceso de diseminación tumoral. De esta manera, el desarrollo de metástasis ganglionares parece ser objeto de la acción de ambas circulaciones, la vascular y la linfática. Existe cierta controversia sobre la función de los vasos linfáticos presentes en el estroma tumoral, ya que algunos autores consideran que los vasos linfáticos iniciales observados en la zona tumoral no son más que vasos preexistentes en el tejido afectado.<sup>90,91</sup> Sin embargo, actualmente se postula la existencia de mecanismos de linfangiogénesis inducidos por el tumor como mediadores en la diseminación ganglionar de los carcinomas de cabeza y cuello.<sup>92</sup>



## **2.3. LINFANGIOGÉNESIS Y PROGRESIÓN TUMORAL**

En los tumores sólidos, el sistema linfático representa una de las principales vías de diseminación de las células neoplásicas fuera del te originario, especialmente en el caso del carcinoma epidermoide. Clásicamente, se ha aceptado que en el carcinoma de cabeza y cuello el proceso metastático tiene lugar siguiendo un patrón escalonado a lo largo de las estaciones cervicales linfáticas y dependiente de la localización del tumor primitivo.<sup>93-96</sup> Estudios recientes han sugerido la capacidad del CEI de metastatizar a los ganglios regionales desde etapas tempranas por medio de las vías de drenaje linfático, sean vasos linfáticos preexistentes o nuevos vasos formados en el seno del tumor.<sup>91</sup> Sin embargo, puede observarse afectación ganglionar en lugares más distales e inesperados sin que se hallen adenopatías patológicas en los niveles previos como sería de esperar.<sup>97,98</sup> Por ello, los mecanismos de diseminación linfática así como los factores que intervienen en ella continúan siendo un tema controvertido y motivo de estudio en la actualidad.

### **2.3.1. MECANISMOS DE DISEMINACIÓN TUMORAL**

El mecanismo de progresión tumoral metastásica del carcinoma epidermoide responde a una compleja cascada de alteraciones moleculares. Estas se inician con la ruptura de la membrana basal por parte de las células tumorales, las cuales pierden su cohesión e invaden los tejidos adyacentes. En este proceso de pérdida de adhesividad se han implicado diversas moléculas como las *cadherinas*, cuya *infra-regulación* parece ser la responsable de la

disgregación de estas células transformadas, facilitando su capacidad invasiva.<sup>99-101</sup> Posteriormente, las células neoplásicas deben migrar por la matriz extracelular para poder acceder a los vasos sanguíneos o linfáticos. Dichos vasos pueden ser preexistentes del tejido huésped o formados *de novo* (*angiogénesis* y *linfangiogénesis*), de modo que las células neoplásicas pueden intravasarse en los mismos para diseminarse.<sup>102</sup> Esta migración por el estroma intersticial requiere de la degradación del mismo por diversos factores producidos por las células cancerígenas o secretados por las células estromales, las cuales han sido activadas tras su interacción con el tejido tumoral. En los últimos años se han publicado diversos estudios sobre la función de las *metaloproteasas* en la degradación de la matriz extracelular, facilitando el proceso de invasión tumoral.<sup>103-105</sup> Al acceder a los vasos e intravasarse, el tumor adquiere un fenotipo metastático que será responsable de la afectación ganglionar regional linfáticos y de las metástasis hematógenas a distancia.

El modo en que las células tumorales penetran en el interior de los vasos linfáticos parece ser un proceso más sencillo que en los vasos sanguíneos. Esto se justifica por la ausencia de la barrera de la membrana basal y de la presencia de uniones intercelulares más débiles en los endotelios linfáticos.<sup>102,106</sup> Además, este endotelio parece tener un papel activo de manera que sus células proliferativas actuarían envolviendo a los émbolos tumorales y los transportarían al torrente linfático en dirección a las estaciones ganglionares linfáticas.<sup>107</sup> Por otro lado, la activación del endotelio linfático por factores secretados por el tumor como diversas citoquinas y factores de crecimiento

facilitaría las metástasis al cambiar las propiedades adhesivas de este endotelio.<sup>91</sup> Estos mecanismos de linfangiogénesis e intravasación son todavía en parte desconocidos.

### **2.3.2. FORMACIÓN DEL SISTEMA LINFÁTICO**

El sistema linfático está constituido por una compleja red de vasos, independiente pero interconectada con el sistema vascular. Por esta red circula el fluido linfático, líquido claro libre de plaquetas que contiene escasos hematíes, abundantes células linfoides y macromoléculas. Esta circulación linfática fue descrita por primera vez en tejidos sanos por Gaspar Aselli en 1627.<sup>108</sup> Debido a las dificultades técnicas para identificar esa fina e intrincada red, los conocimientos sobre la fisiopatología del sistema linfático han evolucionado de forma más lenta que el sistema vascular hasta el siglo XX, donde los refinamientos de las técnicas de microscopía y el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquímica han permitido la identificación topográfica de este sistema, aumentando los conocimientos sobre su formación.<sup>109</sup> Del mismo modo que el sistema vascular, los vasos linfáticos están recubiertos por un endotelio y por una red de fibras musculares lisas en las paredes de los vasos de mayor calibre que les confiere capacidad de contractilidad intrínseca. La membrana basal, a diferencia de los vasos sanguíneos, se identifica ultraestructuralmente como discontinua. La presencia de uniones intercelulares y filamentos de anclaje al estroma intercelular permite la apertura de la luz vascular dependiendo de los cambios de presión generados por el fluido intersticial.<sup>109,110</sup>

La proliferación y migración endotelial, el reordenamiento y la muerte celular programada (apoptosis) así como la producción, degradación y reorganización de la matriz extracelular, parecen ser los principales mecanismos implicados en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis.<sup>109</sup> La controversia sobre el origen embriológico de la circulación linfática ha permanecido hasta principios del siglo pasado. Inicialmente se consideró que los vasos linfáticos y las venas procedían de primordio venoso común.<sup>111</sup> Hoy sabemos que el sistema linfático se origina de forma independiente en el tejido mesenquimal y sólo se une al sistema venoso de forma tardía.<sup>112,113</sup> El desarrollo de los vasos linfáticos es similar al del sistema sanguíneo de modo que se inicia con la formación de una primitiva red capilar que posteriormente sufrirá un proceso de remodelación hasta formar una red vascular linfática madura.<sup>110</sup> En etapas iniciales se produce la expresión del *factor de transcripción homeobox PROX1* en una subpoblación de células endoteliales inmaduras del mesénquima y de otros factores linfáticos específicos como los receptores *VEGFR-3* o *LYVE-1*. El factor de crecimiento vascular endotelial tipo C o *VEGF-C* secretado por el mesénquima subyacente interviene como factor fundamental linfangiogénico. Otras moléculas y hormonas parecen estar relacionadas con los procesos de linfangiogénesis como: el *factor de crecimiento fibroblástico (FGF)*, *factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I)*, *factor de crecimiento epidérmico (EGF)*, sustancias vasoactivas como la *endotelina* y la *prostaciclina*, hormonas como el *estradiol* y factores como la *podoplanina* o la *neurofilina-2 (Nrp-2)* cofactor del *VEGFR-3*.<sup>109,110,114</sup>

### 2.3.3. LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL

La linfangiogénesis tumoral consiste en la formación *de novo* de vasos linfáticos en relación con el tejido tumoral mediada por factores secretados tanto por las células neoplásicas como por las células estromales del huésped. Una de las vías de investigación más novedosas en el estudio del comportamiento del cáncer oral se encuentra relacionada con dichos mecanismos de neoformación. Diversos modelos animales han mostrado evidencia científica sobre el papel de la linfangiogénesis en las metástasis.<sup>115,116</sup> Así mismo, numerosos estudios en el humano han descrito la asociación entre linfangiogénesis, factores linfangiogénicos y el desarrollo de metástasis en diversos tipos de carcinomas como el carcinoma de mama, el carcinoma ovárico, el carcinoma colorrectal, el melanoma maligno y el carcinoma de cabeza y cuello.<sup>92,117-122</sup> No sólo la presencia de la linfangiogénesis se ha correlacionado con el desarrollo de metástasis en el cáncer de cabeza y cuello sino que también parece influir de forma significativa en la supervivencia de los pacientes y en las recidivas loco-regionales.<sup>118,123</sup>

La generación de nuevos vasos linfáticos en el interior del estroma tumoral o linfangiogénesis intratumoral como parte de los mecanismos de crecimiento tumoral ha sido cuestionada por diversos trabajos.<sup>124-128</sup> Estas conclusiones se han debido principalmente a la ausencia de marcadores específicos que permitan la detección de estos vasos linfáticos intratumorales y que pueda discriminarlos frente a los vasos sanguíneos.<sup>102,129</sup> Sin embargo, diversos estudios sobre linfangiogénesis han objetivado la existencia de estos vasos linfáticos intratumorales, con rasgos sugerentes de

neoformación.<sup>92,115,117,123</sup> La reciente descripción de nuevos marcadores linfáticos específicos ha permitido tanto el estudio de estos procesos de linfangiogénesis intratumoral como su importancia pronóstica en la evolución del CEI.

#### **2.3.4. MARCADORES DE LINFANGIOGÉNESIS**

Los primeros marcadores empleados para el estudio de los mecanismos de linfangiogénesis demostraron poca especificidad para identificar el endotelio linfático de modo que la diferenciación con el endotelio vascular era más cuantitativa que cualitativa y sujeta a la interpretación del investigador.<sup>129</sup> A este grupo de marcadores pertenece la *5'-Nucleotidasa* y la *desmoplakina*, esta última identificada en las uniones intercelulares linfáticas (*Tabla 3*).<sup>130</sup> La utilidad del *colágeno IV* y la *laminina* se relacionó con la característica discontinua de la membrana de los capilares linfáticos.<sup>102</sup> Sin embargo, aunque existen diferencias estructurales en la membrana basal de los vasos linfáticos frente a los sanguíneos, se ha observado que en los procesos de angiogénesis los nuevos capilares sanguíneos presentan membranas incompletas o ausentes por lo que no pueden considerarse como marcadores selectivos de vasos linfáticos.

Los marcadores más empleados en los últimos años y considerados selectivos del sistema linfático son: *LYVE-1*, *PROX1*, *VEGFR-3*, *Podoplanina*, *Nrp-2* y *D2-40* (*Tabla 3*).

**LYVE-1** (*lymphatic vessel endotelial hyaluronan receptor-1*) es un receptor polipeptídico transmembrana tipo I que intervine en el metabolismo del hialuronato en el sistema linfático.<sup>131</sup> Este receptor se expresa en el endotelio linfático y en el endotelio de los sinusoides esplénicos de forma selectiva, mientras que está ausente en el endotelio vascular. Por ello, ha sido considerado como marcador de capilares linfáticos en el tejido tumoral por diversos autores.<sup>130,131</sup>

**PROX1** es producto de la síntesis a partir de un gen *homeobox* y está implicado en la regulación del desarrollo temprano del sistema linfático, manteniendo su expresión en el endotelio linfático adulto.<sup>91,132</sup> La delección del gen de este factor produce alteraciones en la neovascularización linfática sin alterar el desarrollo del sistema sanguíneo por lo que se considera como selectivo de linfangiogénesis.

**VEGFR-3 o Flt-4 (*fms-like tyrosine-kinase*)** es el receptor linfangiogénico por excelencia, perteneciente a la familia de receptores tirosin kinasa para VEGF. Se considera específico para los factores VEGF-C y VEGF-D, factores linfangiogénicos por medio de los cuales estimula la neoformación y remodelación linfática.<sup>106,133</sup> Se expresa en una pequeña subpoblación de capilares sanguíneos formados en determinadas condiciones patológicas como los tumores sólidos.<sup>122,134</sup>

**Podoplanina** es una mucoproteína glicosilada de superficie descrita en los podocitos glomerulares del riñón de rata. En el hombre se considera un

marcador selectivo del sistema linfático, ausente en el endotelio vascular sanguíneo.<sup>135,136</sup> Esta molécula se co-localiza con el receptor VEGFR-3 en la membrana endotelial linfática, lo que apoya esta especificidad para identificar vasos linfáticos. La sobreexpresión de podoplanina se ha relacionado en diversos estudios con el aumento de las metástasis ganglionares y la progresión tumoral en el cáncer de cabeza y cuello.<sup>137,138</sup>

**Nrp-2** va a actuar como co-receptor de VEGFR-3 mediando en sus acciones linfangiogénicas,<sup>139</sup> mientras que **D2-40**, marcador específico para podoplanina, han sido descrito recientemente en estudios sobre el melanoma invasivo así como en el carcinoma epidermoide de cavidad oral.<sup>122,137,140</sup>



MARCADOR LINFÁTICO	TIPO MOLECULAR	LOCALIZACIÓN	ACTIVIDAD BIOLÓGICA	REFERENCIAS
<b><i>Desmoplakina</i></b>	Proteína de adhesión asociada a cadherina en complejos adhesión del endotelio linfático	Pequeños capilares linfáticos, expresión en vasos sanguíneos en cultivos celulares, células epiteliales, músculo cardíaco	Facilita el paso de macromoléculas e iones a través de las uniones intercelulares	Al-Rawi et al, 2005 (130) Schmelz et al, 1994 (141)
<b><i>LYVE-1</i></b>	Receptor del hialuronato en endotelio linfático (similar a CD44)	Endotelio linfático, sinusoides esplénicos, hígado y pulmón fetal, páncreas, corazón, glándulas adrenales, tiroides, placenta	Transporte del hialuronato de la matriz extracelular a los ganglios linfáticos	Baneji et al, 1999 (131) Al-Rawi et al, 2005 (130)
<b><i>PROX1</i></b>	Factor transcripcional (gen HOMEBOX)	Endotelio linfático, hígado, páncreas, corazón, sistema nervioso	Desarrollo sistema linfático	Wigle et al, 1999 (132) Stacker et al, 2002 (91)
<b><i>VEGFR-3</i></b>	Receptor tiroxin kinasa con 6 dominios IG extracelulares	Endotelio linfático, se reactiva en capilares sanguíneos en condiciones patológicas	Receptor de VEGF-C y VEGF-D. Modula la respuesta inmune	Partanen et al, 1999 (134) Chen et al, 2001 (142)
<b><i>Podoplanina</i></b>	Glicoproteína transmembrana tipo mucina de 38 kDa de los podocitos glomerulares	Co-expresión con VEGFR-3 en endotelio linfático, riñón, células alveolares tipo-1 de pulmón, plexo coroideo, piel, ovario, células mioepiteliales	Regulación permeabilidad y la integridad vascular linfática	Breitender-Geleff et al, 1999 (135) Krierhuber et al, 2001 (136) Sleeman et al, 2001 (129)
<b><i>Nrp-2</i></b>	Receptor de VEGF y PGF	Co-expresión con VEGFR-3 en endotelio linfático		Tammela et al, 2005 (139)
<b><i>D2-40</i></b>	Anticuerpo monoclonal contra O-sialoglicoproteína, recientemente descrito para podoplanina	Endotelio linfático	Estudio linfangiogénesis en melanoma invasivo	Giorgadze et al, 2004 (140) Schacht et al, 2005 (137) Miyahara et al, 2007 (122)

Tabla 3. Diferentes marcadores empleados en el estudio de la linfangiogénesis.

Actualmente se considera que los marcadores que han mostrado mayor especificidad para la detección de vasos linfáticos son la *Podoplanina*, *LYVE-1*, *D2-40* y el marcador linfático *caracterizado por nuestro grupo PA2.26/podoplanina*.<sup>143</sup>

El antígeno **PA2.26** es una glicoproteína transmembrana tipo mucina de 172 aminoácidos, con un ectodominio rico en serinas y treoninas. PA2.26 fue descrita por primera vez en los queratinocitos transformados de la piel del ratón durante el proceso de carcinogénesis y en los fibroblastos del estroma tumoral.<sup>144</sup> Este antígeno está ausente en las células epidérmicas normales del ratón pero se ha observado una inducción de su expresión en las líneas celulares del carcinoma escamoso y otros carcinomas producidos in vivo en el laboratorio. Sin embargo, se ha identificado la expresión de esta proteína en otro tipo de tejidos como en las células alveolares del pulmón, el plexo coroideo, el epitelio endotelial del sistema nervioso, el mesotelio peritoneal y pericárdico, los podocitos del glomérulo renal y las células parietales de la cápsula de Bowman, así como en las células endoteliales de los vasos linfáticos.<sup>143</sup> Este antígeno está ausente en el endotelio del sistema arterial, venoso y en el endocardio, por lo que puede considerarse como específico del sistema linfático, siendo muy útil para su diferenciación con los vasos sanguíneos. Se ha visto que su secuencia es similar a la secuencia de la podoplanina humana por lo que parece que juegan papel similar en los vasos linfáticos y hoy sabemos que son realmente la misma proteína.<sup>145</sup> Estudios de inmunofluorescencia en cultivos celulares, han mostrado que esta proteína se encuentra localizada a nivel ultraestructural en la membrana plasmática de las

prolongaciones celulares como micovilli, lamelipodios y otras estructuras de superficie ricas en actina. PA2.26 parece estar muy relacionado con los filamentos de actina del citoesqueleto. Su elevada expresión en las zonas de la membrana celular donde se concentran estos filamentos si sugiere su relación con los mecanismos de motilidad celular. Estos resultados se confirman en estudios de microscopía confocal en líneas celulares de carcinoma espinocelular.<sup>146</sup> El acumulo de PA2.26 en estructuras responsables de la dinámica celular sugiere un papel activo de la molécula en los procesos de migración y de tumorigénesis. La caracterización de esta glicoproteína en tejidos humanos ha sido posible gracias a la obtención en el laboratorio de un anticuerpo policlonal contra el antígeno PA2.26 humano, mediante la inmunización en conejos con un polipéptido sintético (Leu-Glu-Gly-Gly-Val-Ala-Met-Pro-Gly-Ala-Glu-Asp-Asp-Val-Val) que contiene 37 a 51 aminoácidos del ectodominio del PA2.26.<sup>144</sup> Las técnicas de inmunohistoquímica mediante este anticuerpo específico han permitido la identificación estructuras linfáticas en el interior del tejido tumoral en el CEI.<sup>123,145</sup>

Con los marcadores descritos, los vasos linfáticos ya pueden ser cuantificados pero queda por determinar su correlación con el pronóstico del cáncer de cabeza y cuello, así como las posibles implicaciones terapéuticas del conocimiento de estos procesos. Adicionalmente, deberían determinarse los factores que regulan estos mecanismos de linfangiogénesis en el tejido tumoral y que, por tanto, van a intervenir en la evolución de los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. El factor que clásicamente se ha descrito como el principal inductor de linfangiogénesis es el VEGF-C, cuya sobre-expresión

parece correlacionarse con un aumento de la vascularización linfática del tumor.<sup>114,115,117,118,</sup>

### 2.3.5. VEGF-C COMO FACTOR LINFANGIOGÉNICO

En el momento actual, se considera como principal mecanismo mediador en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis la acción de la familia de los factores de crecimiento vascular endotelial o VEGF. Esos factores han sido bien caracterizados por múltiples estudios sobre la génesis y remodelación de los sistemas vascular y linfático, de modo que hoy se conocen tanto sus procesos de síntesis y sus mecanismos de acción en condiciones normales o patológicas. La familia del VEGF está compuesta por seis miembros con un origen genético común pero diferente modo de expresión y acción: **VEGF-A, VEGF-B, Factor de crecimiento placentario o PlGF, VEGF-C, VEGF-D, y VEGF-E** (Tabla 4).<sup>139,147-151</sup> En los procesos de linfangiogénesis se han implicado dos principales factores, VEGF-C y VEGF-D, ligandos del receptor linfangiogénico VEGFR-3.

**VEGF-C** o **VEGF-related protein (VRP)** se considera el principal factor linfangiogénico y su participación en la progresión de diversos tipos de carcinomas ha sido estudiada por diversos autores.<sup>152,153</sup> Este factor de crecimiento se expresa predominantemente en regiones de desarrollo vascular linfático, proceso mediado in vivo por la interacción de VEGF-C y el receptor VEGFR-3. Actúa como factor de neoformación vascular, así como factor mitógeno sobre el endotelio y aumenta la superficie funcional linfática en los

márgenes del tumor, lo cual va a facilitar las metástasis linfáticas.<sup>128</sup> Se ha observado que las células tumorales sobre-expresan tanto VEGF-C como VEGF-D favoreciendo el desarrollo de estas metástasis.<sup>147,152-155</sup> Para identificar la presencia de VEGF-C en las muestras de tejido tumoral, las técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos policlonales han permitido el estudio de su patrón de expresión, tanto en el citoplasma de las células tumorales como en las células del estroma y en el endotelio linfático.

***VEGF-D* o *c-fos induced growth factor (FIGF)*** presenta similares características linfangiogénicas y angiogénicas que VEGF-C in vivo, actuando como ligando de VEGFR-2 y VEGFR-3. En estudios experimentales sobre tumores se ha visto que su expresión aumenta la producción de vasos linfáticos y se correlaciona con el desarrollo de metástasis linfáticas regionales, así como con la disminución de las tasas de supervivencia.<sup>106,116,147</sup>

FACTOR	SINTESIS	FACTORES REGULADORES	RECEPTOR	MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIAS
<b>VEGF o VEGF-A</b>	6 isoformas tras síntesis proteica de ocho exones codificantes del mRNA (VEGF <sub>121</sub> , VEGF <sub>145</sub> , VEGF <sub>165</sub> , VEGF <sub>183</sub> , VEGF <sub>189</sub> , VEGF <sub>206</sub> ). Cada isoforma posee una función biológica distinta	EGF, FGF, PDGF, IGF-1, TNF, HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, Hipoxia, Oncogenes c-fos, ras, delección p53	VEGFR-1 VEGFR-2 Neurofilina-1 (Nrp-1) Neurofilina-2 (Nrp-2)	Angiogénesis (neoformación y proteolisis matriz extracelular) Función quimiotáctica e inflamatoria, movilización células hematopoyéticas, estimula síntesis ósea, acción protectora neuronal	Riedel et al, 2000 (156) McColl et al, 2004 (150) Neuchrist et al, 1999 (157)
<b>VEGF-B o VRF</b>	2 isoformas tras síntesis proteica selectiva (VEGF-B <sub>167</sub> VEGF-B <sub>186</sub> )	Hipoxia	VEGFR-1 Nrp-1	Angiogénesis Metabolismo energético celular (músculo estriado, miocárdio, grasa parda)	Tammela et al, 2005 (139) McColl et al, 2004 (150)
<b>VEGF-C o VRP</b>	Como precursor proteico activado por convertasas intracelulares (isoformas) Subunidades secretadas 31/29 kDa unidas por puentes SH son proteolizadas en la matriz extracelular para unirse a sus receptores	Hipoxia (HIF 1- $\alpha$ ), Prostaglandina E2 (Cox2), IL-1, IL-7, TNF- $\alpha$	VEGFR-2 VEGFR-3 Nrp-2	Desarrollo sistema linfático (VEGFR-3): neoformación, acción mitógena, mayor superficie funcional Regulación permeabilidad vascular sanguínea (VEGFR-2) Regulación función inmunitaria	Al-Rawi et al, 2005 (130) Tammela et al, 2005 (139) McColl et al, 2004 (150) Padera et al, 2002 (128) Ali, 2008 (114)
<b>VEGF-D o FIGF</b>	Similar procesamiento y regulación por el microambiente extracelular que VEGF-C	Factores de transcripción AP-1, $\beta$ -catenina, contactos celulares	VEGFR-2 VEGFR-3 Nrp-2	Desarrollo sistema linfático (VEGFR-3), regulación permeabilidad vascular sanguínea (VEGFR-2)	Tammela et al, 2005 (139) McColl et al, 2004 (150)
<b>PlGF</b>	Descrito inicialmente en tejido placentario 3 isoformas (PlGF-1, PlGF-2 y PlGF-3)		VEGFR-1 VEGFR-2 Nrp-1	Aumenta la acción de VEGF-A sobre la angiogénesis	Park et al, 1994 (158)
<b>VEGF-E</b>	Factor de reciente descripción		VEGFR-2	Angiogénesis	Meyer et al, 1999 (159)

Tabla 4. Características de los diferentes miembros de la familia de VEGF.

## **2.4. HIPOXIA Y FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA HIF-1ALPHA**

### **2.4.1. HIPOXIA TUMORAL**

En el momento actual, es cada vez más evidente que el microambiente tumoral juega un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos. La proliferación tumoral y la hipoxia tisular son factores esenciales implicados en la progresión tumoral. En aproximadamente un 50% de todos los tumores sólidos se detecta un grado relevante de hipoxia que es independiente del tamaño tumoral y de las características biológicas.<sup>160</sup> La hipoxia tumoral se asocia con un peor pronóstico en determinados tipos tumorales como el carcinoma de mama, el carcinoma de cérvix y el carcinoma de cabeza y cuello.<sup>161,162</sup> La hipoxia parece actuar promoviendo la inestabilidad genética, la invasividad de las células tumorales y las metástasis, de modo que se ensombrece el pronóstico y disminuye la respuesta a determinadas terapias como la radioterapia o la quimioterapia.<sup>163</sup>

La proliferación celular es otro factor relevante en el pronóstico del carcinoma de cabeza y cuello.<sup>164,165</sup> El aumento del ritmo de proliferación va a afectar a otra serie de factores como el grado de diferenciación celular, la regulación de genes del ciclo celular y el microambiente tumoral, creando una situación de baja oxigenación y falta de nutrientes. En condiciones de hipoxia, las células neoplásicas van a enlentecer su paso por el ciclo celular acumulándose en la fase G2 del ciclo, lo cual va a permitir la readaptación celular y la selección de aquellas células que han perdido los mecanismos apoptóticos adquiriendo, por lo tanto, un fenotipo más agresivo.<sup>165,166</sup>

La hipoxia tumoral surge debido a un desbalance entre consumo y aporte de oxígeno en el tejido neoplásico. Ésta puede ser consecuencia de diversos mecanismos patológicos como la deficiente vascularización tumoral, una perfusión tisular limitada, o la anemia asociada a la enfermedad tumoral o a los tratamientos empleados que reducen el aporte de oxígeno de la sangre.<sup>165</sup> Se distinguen dos tipos de hipoxia tumoral:<sup>167</sup>

- La “*hipoxia perfusión-limitada*”, que generalmente es aguda y transitoria, debida a anormalidades funcionales y estructurales de la microcirculación tumoral.

- La “*hipoxia difusión-limitada*”, debida al aumento de la distancia de difusión en el tejido tumoral por su expansión y crecimiento que genera una situación crónica de privación de oxígeno y otros nutrientes.

Generalmente en los tumores coexisten los dos tipos de hipoxia lo cual supone la puesta en marcha de mecanismos adaptativos como la inhibición de la apoptosis, la regulación de la angiogénesis y el aumento de la glicolisis anaerobia.<sup>89,168</sup>

La anemia ha sido clásicamente considerada un factor fundamental en la hipoxia tumoral y en la resistencia a diversos tratamientos como la radioterapia. Diversos estudios han sugerido una correlación entre los niveles bajos de Hb y un mal pronóstico del cáncer de cabeza y cuello.<sup>169-171</sup> Sin embargo, otros autores describen la existencia una situación de hipoxia en el tejido tumoral en pacientes con niveles adecuados de Hb, que parece ser debido a un defecto de difusión de la Hb por una deficiente vascularización. También se describe la



situación opuesta de normoxia tumoral en pacientes anémicos pero con un flujo sanguíneo adecuado que contrarresta los niveles bajos de Hb. Por ello, se concluye que la anemia no es un buen indicador de hipoxia ya que en ésta influyen otros factores independientes de las concentraciones de Hb del paciente.<sup>89</sup>

Para poder investigar los factores que intervienen en los mecanismos de hipoxia así como en sus efectos, los estudios más recientes se centran en el análisis de diversas proteínas endógenas que se inducen en las situaciones de baja oxigenación del tejido tumoral. Entre ellas se encuentra el factor inducible por hipoxia, ya que se ha sugerido su sobreexpresión en diversos tipos tumorales, así como su influencia en el pronóstico del cáncer de cabeza y cuello.<sup>89,172-177</sup>

#### **2.4.2. HIF-1 $\alpha$**

El *Factor Inducible por Hipoxia 1* o *HIF-1* es uno de los elementos clave para la adaptación y supervivencia celular en las situaciones de hipoxia. Este factor es un heterodímero con estructura proteica en doble hélice que está compuesto por dos subunidades de 120 y 80 kDa respectivamente, ***HIF-1 $\alpha$***  y ***HIF-1 $\beta$*** .<sup>176</sup> En situación de normoxia, la subunidad  $\alpha$  es sometida a hidroxilación, ubiquitinación y degradación proteosómica manteniendo niveles de HIF-1 bajos.<sup>178</sup> Sin embargo en situación de hipoxia se bloquea este mecanismo de degradación con lo que se acumula rápidamente esta proteína en las células hipóxicas. Para que HIF-1 adquiriera su actividad post-

transcripcional completa requiere de ambos dominios N-terminal y C-terminal de la subunidad  $\alpha$ , ya que el dominio N-terminal es esencial para la unión de HIF-1 con el ADN y la dimerización, mientras que el C-terminal contiene dos dominios de *trans*-activación y localizadores nucleares de señales.<sup>176</sup> Por lo tanto, HIF-1 $\alpha$  determina la actividad de HIF-1 y activa la transcripción de otros genes inducidos por hipoxia como el VEGF, la NO sintetasa, diversas enzimas del metabolismo de la glucosa o la eritropoyetina (EPO).

En situaciones de normoxia, las prolin hidroxilasa (PHD1, PHD2 y PHD3) modifican dos de los residuos prolina del dominio de degradación dependiente de oxígeno ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) de la porción central de HIF-1 $\alpha$  e hidroxilan esta subunidad, utilizando como cofactores el hierro y el ascorbato.<sup>175,179-181</sup> La proteína del gen supresor de Von Hippel Lindau (pVHL) se une a HIF-1 $\alpha$  hidroxilado en su dominio N-terminal de transactivación o N-TAD (*N-terminal transactivation domain*), próximo a ODDD, y se produce la degradación proteosómica de HIF-1 $\alpha$  y la poliubiquitinización por el complejo ubiquitín ligasa.<sup>176,181</sup> La propia pVHL actúa como una E2 ubiquitín ligasa ejerciendo su acción sobre N-TAD de HIF-1 $\alpha$  para su inactivación y degradación.<sup>88</sup> Otros procesos que intervienen en la infraregulación de HIF-1 $\alpha$  son la hidroxilación del dominio C-terminal por asparagina hidroxilasas, la acción del factor inhibitorio de HIF o FIH (*factor-inhibiting HIF*) sobre los coactivadores p300/CBP del C-terminal, o la acetilación de residuos lisina en el ODDD.<sup>176,181</sup> El pVHL se considera por tanto otro factor de regulación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  ya que se ha observado que la pérdida de función de este factor en ausencia de hipoxia hace que se

estabilice HIF-1 $\alpha$  y que se induzca la transcripción de genes.<sup>88,165,181</sup> En un estudio de *Jokilehto* y *cols*, se observó la sobre-expresión de PHD2, principal isoforma implicada en la infra-regulación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de oxigenación, para muestras de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.<sup>175</sup> Sin embargo, su expresión no se correlacionó con la infra-regulación de HIF-1 $\alpha$  de forma significativa por lo que PHD2 no es suficiente para el control de HIF-1 $\alpha$  y deben existir otros mecanismos implicados en esta regulación.

HIF-1 $\alpha$  se va a estabilizar en condiciones de hipoxia por la inactivación de la hidroxilación por las PHDs y por la pérdida de la interacción con pVHL, la ubiquitinización y la degradación proteosómica. El resultado consiste en la acumulación nuclear de HIF-1 $\alpha$  lo cual va a permitir su heterodimerización con HIF-1 $\beta$ , su traslocación nuclear y la activación de la transcripción en el ADN nuclear de otros genes inducibles por la hipoxia.<sup>88</sup> Se han descrito más de sesenta genes que son activados por HIF-1 $\alpha$ . Entre estos genes se encuentra: la familia del *VEGF*, la *NO sintetasa*, la *EPO* y su receptor específico transmembrana (receptor *EPO* o *EPOR*), las *ciclinas G2*, el *factor de crecimiento insulínico tipo 2*, el *TNF*, diversas enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa como los *transportadores de glucosa tipo 1 y 3* (*GLUT-1* y *GLUT-3*) o las *hexoquinasas*, diversas enzimas del metabolismo de los aminoácidos o del metabolismo de los nucleótidos como las *leptinas*, diversas enzimas la regulación del pH celular como la *anhidrasa carbónica IX* (*CA-IX*) o diversas proteínas del metabolismo de la matriz extracelular, el citoesqueleto y de adhesión como las *PDHs*, la *vimentina* y la *metaloproteinasa-2*.<sup>165,172,174</sup> VEGF va a intervenir de forma activa en los

procesos de neo-angiogénesis tumoral, mientras que la EPO no sólo estimula la neovascularización sino que también parece intervenir en la selección celular y la protección contra la apoptosis y, por tanto, en la progresión tumoral.<sup>165</sup> Estudios sobre cáncer de cabeza y cuello muestran una coexpresión de HIF-1 $\alpha$  y EPO, así como una correlación entre los niveles de EPO y la hipoxia tumoral.<sup>182</sup> Así mismo, en un estudio de *Roh y cols*, la sobre-expresión de EPOR se muestra como un factor pronóstico independiente de supervivencia en tumores T2 de lengua.<sup>177</sup> Respecto a CA-IX, se ha observado la presencia de un gradiente de expresión en el carcinoma de cabeza y cuello de modo que esta proteína se expresa con mayor intensidad en zonas tumorales adyacentes a los focos de necrosis. En estos tumores, la sobre-regulación de CA-IX se ha relacionado con la agresividad tumoral y se ha correlacionado con el control local y la supervivencia global.<sup>183,184</sup>

#### **2.4.2.1. HIF-1 $\alpha$ Y CANCER ORAL**

En relación con los procesos neoplásicos, HIF-1 $\alpha$  ejerce diferentes acciones que van a influir en la progresión tumoral afectando el pronóstico de la enfermedad. Se ha observado que los tumores sólidos con abundantes áreas de hipoxia presentan un peor pronóstico que los tumores bien oxigenados y que esto parece ser independiente del tipo tratamiento.<sup>176</sup> Esto es consecuencia del aumento en la viabilidad de las células tumorales hipóxicas por la acción fundamental de HIF-1 $\alpha$ ; de esta manera el tumor adquiere un fenotipo más agresivo. Las vías moleculares reguladas por HIF-1 $\alpha$  en esta

situación van a ser la angiogénesis, la glicólisis anaerobia, la interrupción de la apoptosis o el aumento de la actividad del ciclo celular.<sup>176,178</sup>

#### **2.4.2.1.1. Angiogénesis y VEGF**

La angiogénesis tumoral es el principal mecanismo de crecimiento local y de metástasis en los tumores sólidos y, por tanto, un factor de mal pronóstico. La familia de VEGF es el principal factor estimulador de este proceso que actúa sobre microcirculación de manera paracrina induciendo la proliferación, diferenciación y migración de las células endoteliales, aumentando la permeabilidad capilar vascular y previniendo la apoptosis de estas células endoteliales.<sup>178</sup> Otros factores inducidos por HIF-1 $\alpha$  que van a intervenir en la neo-angiogénesis van a ser la NO sintetasa o la timidina fosforilasa.<sup>176</sup> HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia, regula la transcripción de VEGF y la actividad post-transcripcional tanto de estas moléculas como de sus receptores.<sup>148,150,157,176,</sup> VEGFA y VEGFB son los principales factores implicados en los procesos de angiogénesis (*Tabla 4*).

**VEFG** o **VEFG-A** es un potente factor angiogénico, que actúa sobre los receptores VEGFR-1 y VEGFR-2. Se sabe que la expresión de VEGF está incrementada en aquellas zonas de angiogénesis activa, no sólo como factor estimulante de estos procesos sino también como factor proteolítico de la matriz extracelular promoviendo la expresión de proteasas para la degradación de esta matriz alrededor de los vasos en formación. En prácticamente todos los tumores sólidos y alguna neoplasia hematopoyética, la expresión de este factor

se encuentra elevada y se ha correlacionado con la microcirculación, con la progresión tumoral y la supervivencia.<sup>5,156,157,178,185-187</sup>

***VEGF-B* o *VEGF-related factor (VRF)*** es otro factor angiogénico, ligando del receptor *VEGFR-1*. En el cáncer oral, se ha observado el aumento de expresión de VEGF-B y su correlación con el desarrollo de la microcirculación vascular en el estroma tumoral.<sup>153</sup>

#### **2.4.2.1.2. Glicólisis anaerobia**

Las células tumorales presentan una alta tasa de glicólisis para producir ATP por fosforilación oxidativa y poder desarrollar sus funciones celulares y multiplicarse. Cuando aumenta la masa tumoral en tumores expansivos, se produce un alto consumo de glucosa y disminuyen los niveles de oxígeno de manera que la glicólisis anaerobia pasa a ser la principal vía de generación de ATP.<sup>176</sup> Esta vía parece estar regulada por HIF-1 $\alpha$  al inducir la transcripción de las enzimas glicolíticas como la aldolasa A, la fosfoglicerato kinasa 1, la piruvato kinasa M o la lactato deshidrogenasa. Estos procesos de generación de energía permiten la supervivencia celular en un ambiente hostil. Otras moléculas esenciales como GLUT1 para el transporte intracelular de glucosa o la hexokinasa para la transformación celular de la glucosa son también inducidas por HIF-1 $\alpha$ .

#### **2.4.2.1.3. Inhibición de la apoptosis o immortalización**

Las células tumorales se caracterizan por un crecimiento incontrolado cuyo primer paso es superar la senescencia o envejecimiento celular. El ADN telomérico está involucrado en este fenómeno de envejecimiento de modo que en cada replicación celular se va acortando hasta que llega un momento en que impide más divisiones y la célula se vuelve senescente.<sup>176</sup> En los tumores sólidos, este proceso se interrumpe por la acción de las telomerasas que se activan para estabilizar el ADN telomérico. La hipoxia y HIF-1 $\alpha$  juegan un papel fundamental ya que inducen la expresión de las telomerasas a modo de respuesta anti-apoptótica.<sup>188,189</sup> La implicación del ADN telomérico en el cáncer y el envejecimiento y la función de las telomerasas ha sido objeto de los trabajos realizados por los recientes *Premio Nobel de Medicina 2009* los Dres. *Elizabeth Blackburn, Carol Greider y Jack Szostak*.<sup>190</sup> Otras proteínas anti-apoptóticas que se van a expresar mediadas por HIF-1 $\alpha$  van a ser Bcl-2, Bcl-xL o BNIP3.

#### **2.4.2.2. POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$**

Como se ha descrito previamente, la expresión de HIF-1 $\alpha$  se ve alterada por las situaciones de hipoxia en las que se produce una inhibición de su degradación y una acumulación celular de este factor, con la puesta en marcha de una cascada de eventos para la adaptación celular. Sin embargo, recientemente se ha observado el aumento de los niveles de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de normoxia, sin que se objetiven otras alteraciones como la pérdida de función de pVHL u otros factores reguladores.<sup>181</sup>

Esto hace pensar que mecanismos hipoxia-independientes pueden alterar la expresión de HIF-1 $\alpha$ .

En los últimos diez años, se ha descrito la existencia de **polimorfismos** en el gen de HIF-1 $\alpha$  en diferentes tumores sólidos que parecen incrementar la actividad de este factor en condiciones normales de oxigenación, como en el carcinoma renal, el adenocarcinoma colorrectal, los carcinomas de endometrio, cérvix y ovario, el adenocarcinoma de próstata, el carcinoma esofágico y en el carcinoma de cabeza y cuello.<sup>88,180,181,191-194</sup> Según *Tanimoto y cols*, estas variantes polimórficas de HIF-1 $\alpha$  presentan un mayor índice transcripcional con respecto a la variante normal tanto en condiciones normales de oxígeno como en hipoxia, por lo que el polimorfismo de HIF-1 $\alpha$  parece estar implicado en el modelo individual de progresión tumoral de cada tumor.<sup>88</sup>

Un *polimorfismo genético* es una variante alélica de un gen que existe de forma estable en una población, por lo que para considerarse como polimorfismo éste debe presentarse con una frecuencia de al menos un 1%. Por lo tanto se diferencia de una mutación en que ésta es mucho menos frecuente y va asociada generalmente a enfermedades hereditarias.<sup>195</sup> Así mismo, se distinguen dos tipos de polimorfismos genéticos: los polimorfismos de repetición en tándem o VNTR (*variable number of tandem repeats*) y los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Dentro de los VNTR existen dos variantes: los VNTR-microsatélites, en los cuales la repetición en tándem de secuencias incluyen de 2 a 5 nucleótidos y los VNTR-minisatélites, que se corresponden con secuencias de ADN de unas

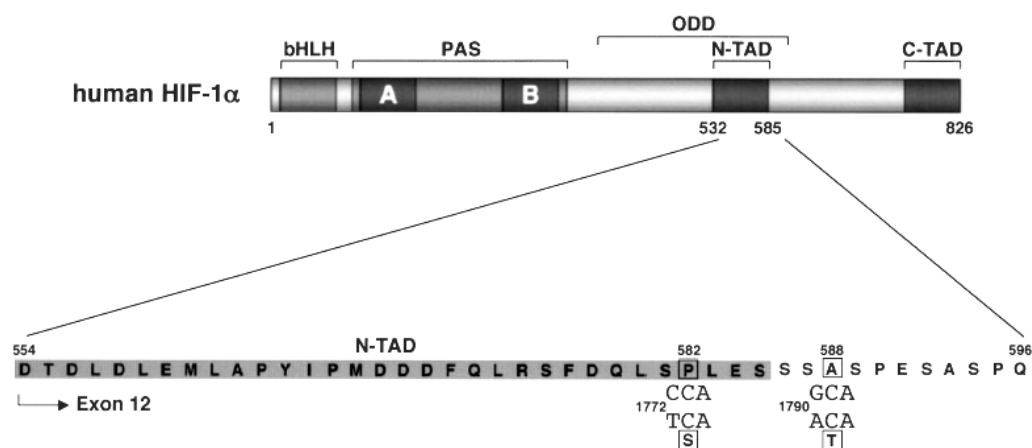


pocas decenas de pares de nucleótidos.<sup>195</sup> Los microsatélites están distribuidos por casi todo el genoma de forma homogénea y presentan un número elevado de alelos similares entre sí, mientras que los minisatélites no están distribuidos por todo el genoma y sirven sólo para identificar un número reducido de enfermedades. Los SNP son el tipo de polimorfismo más frecuente en el genoma humano, los cuales pueden ocurrir tanto en regiones codificantes (exones) como no codificantes (intrones y promotores). Si esta variación ocurre en un exón, la probabilidad de alteración de la función biológica de una proteína se eleva por la sustitución de un aminoácido por otro. Debido a que el ADN no codificante es mayor, la probabilidad de que un SNP se dé en éste es mayor, pero en ocasiones ocurren SNP en promotores de genes y pueden alterar la afinidad por la unión de factores transcriptores de ese gen o la actividad de intensificadores de expresión del gen o *enhancers*, alterándose la transcripción y los niveles de la proteína resultante.<sup>195,196</sup> Los polimorfismos del gen de HIF-1 $\alpha$  descritos recientemente pertenecen al grupo de polimorfismos SNP de tipo codificante.

Existen dos polimorfismos de reciente descripción localizados en el exón 12 del gen para HIF-1 $\alpha$ , próximos al N-TAD, imprescindible para la regulación dependiente de oxígeno: **P582S** y **A588T** (*Figura 1*). En el polimorfismo P582S, también denominado **C1772T**, se produce un cambio de base de una citosina (C) por una timidina (T) en la posición 1772 resultando en la sustitución de una prolina (Pro) por una serina (Ser) en el codón 582 del exón 12. En el A588T o **G1790A** la base cambiada es una guanina (G) por una adenina (A) en posición 1790 resultando una sustitución de una alanina (Ala) por una treonina (The) en

el codón 588.<sup>88,180,181,193,194</sup> La presencia de uno de estos polimorfismos va a determinar una alteración en la regulación de HIF-1 $\alpha$ , con un aumento de la transcripción de este factor. Dicha modificación parece deberse a una alteración de la estabilidad de la proteína en las variantes polimórficas, por un mecanismo todavía no completamente conocido.<sup>88</sup> Otro mecanismo que parece implicado en este evento es el reclutamiento de otros coactivadores de transcripción como p300/CBP o SRC-1 que interaccionan con HIF-1 $\alpha$  a través de cambios conformacionales causados por la sustitución de aminoácidos en las variantes polimórficas.<sup>197</sup>

Estos dos polimorfismos han sido estudiados en diversos carcinomas como el carcinoma renal, el carcinoma de ovario, endometrio y cérvix, el carcinoma de esófago, el adenocarcinoma de próstata, el adenocarcinoma colorrectal y en el carcinoma de cabeza y cuello.<sup>88,180,181,192-194</sup> Se ha sugerido que juegan un papel importante en la patogénesis y la progresión de estos tumores así como una mayor predisposición a sufrir la enfermedad respecto a la población general. Así mismo, en el carcinoma de cabeza y cuello se ha correlacionado de forma significativa la presencia de un alelo polimórfico con un aumento en el número de microvasos sanguíneos.<sup>88</sup>



*Figura 1.* Polimorfismos de HIF-1α. Estructura de HIF-1α (imagen superior). Dominios funcionales de la proteína: *bHLH* (dominio básico en doble hélice); *PAS* (dominio Per-Arnt-Sim); *ODD* (dominio de degradación dependiente de oxígeno); *N-TAD* (dominio N Terminal de transactivación); *C-TAD* (dominio C Terminal de transactivación). Secuencia de aminoácidos en exón 12 (imagen inferior). Posición de los aminoácidos sustituidos en los polimorfismos C1772T y G1790A del N-TAD: sustitución de prolina por serina en el codón 582 (C1772T) y sustitución de arginina por treonina en el codón 588 (G1790A). Tomado de Tanimoto y cols, 2003.<sup>89</sup>



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



### 3.1. ANTECEDENTES AL ESTUDIO

Dado que un 25% de los estadios precoces del CEI presenta una mala evolución, existe notable controversia en cuanto al esquema de tratamiento a seguir en estos pacientes. Estos tumores pueden desarrollar recidivas loco-regionales a pesar de tratarse de estadios teóricamente curables con el tratamiento primario, lo cual empeorará las tasas de supervivencia. Estos hechos plantean los siguientes interrogantes: ¿se debe hacer una *disección cervical* en todos los casos o qué factores deben de tenerse en cuenta a la hora de planificar esta cirugía?, ¿en qué casos se debe utilizar la radioterapia o incluso la quimioterapia postoperatoria?, ¿conviene ampliar el margen de resección en determinados casos seleccionados? Por todo ello, deben existir otros factores intrínsecos al tumor e independientes del tratamiento realizado que influyan en esta evolución tórpida y que se escapan a los análisis clínico-patológicos convencionales.

La linfangiogénesis es uno de los eventos que tiene lugar en el proceso de progresión tumoral, facilitando el transporte linfático de células tumorales a otros tejidos. Se ha demostrado la existencia de estos mecanismos de neoformación linfática en el interior del estroma tumoral, frente a la linfangiogénesis peritumoral, y dichos mecanismos parecen influir en el pronóstico del CEI.

Así mismo, la expresión de HIF-1 $\alpha$  parece correlacionarse con el pronóstico del carcinoma de cabeza y cuello. La descripción de los polimorfismos C1772T y G1790A puede estar implicada en la predisposición a

desarrollar carcinomas aunque no sabemos exactamente que implicación pronóstica puede tener en la evolución de la enfermedad.

El presente estudio pretende definir el papel que juegan tanto la linfangiogénesis intratumoral como el polimorfismo HIF-1 $\alpha$  de en el caso del CEI.

### **3.2. HIPÓTESIS**

Como hipótesis de trabajo sugerimos que la linfangiogénesis intratumoral interviene de forma significativa en el desarrollo de recidivas loco-regionales y en la supervivencia de los pacientes con estadios precoces del CEI (H1), asumiendo como hipótesis nula (H0) que no existen diferencias entre los pacientes que muestran vasos linfáticos en el interior del estroma tumoral frente a los que no se identifica su presencia.

Así mismo sugerimos como hipótesis de trabajo (H1) que la presencia de los polimorfismo de HIF-1 $\alpha$  intervienen en la predisposición a desarrollar un CEI y éstos influyen en la supervivencia y la aparición de recidivas de los pacientes con CEI, asumiendo como hipótesis nula (H0) que la presencia de dichos polimorfismos no influye en la predisposición y el pronóstico del CEI.



### 3.3. OBJETIVOS

OBJETIVO 1: Identificar la presencia de vasos linfáticos intratumorales en los casos con estadios precoces de CEI.

OBJETIVO 2: Analizar la influencia de los vasos linfáticos intratumorales en el pronóstico del cáncer oral, tanto en el desarrollo de recidivas loco-regionales como en la supervivencia.

OBJETIVO 3: Determinar las frecuencias genotípicas asociadas a los polimorfismos C1772T y G1790A de HIF-1 $\alpha$  en un grupo de pacientes con CEI y establecer las posibles diferencias con la población general.

OBJETIVO 4: Analizar si estos polimorfismos influyen sobre la aparición de recidivas loco-regionales o sobre la supervivencia en los pacientes con CEI.

OBJETIVO 5: Analizar la posible correlación entre la linfangiogénesis intratumoral, la presencia de los polimorfismos C1772T y G1790A de HIF-1 $\alpha$  y otros factores clínico-patológicos.



## **PACIENTES Y MÉTODO**



## 4.1. PACIENTES

### 4.1.1. MUESTRA DE ESTUDIO

Para la realización de este estudio retrospectivo se analiza una serie de pacientes con CEI en estadios precoces (tumores menores de 4 cm. de diámetro sin ganglios cervicales positivos), recogida en la *Base de Datos de Oncología del Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid*. De un total de 501 pacientes de dicha base, se seleccionan 124 casos con estadios precoces que han sido tratados en nuestro servicio y que cumplen los siguientes *criterios de selección*:

- Pacientes con CEI cuyo tumor primario ha sido tratado quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid.
- Pacientes que no hayan recibido quimioterapia y/o radioterapia preoperatoria coadyuvante o terapéutica.
- Pacientes clasificados como estadios precoces (pT1 y pT2 de la clasificación TNM) tras el estudio histológico postoperatorio. En aquellos casos en los cuales se realiza una disección cervical electiva asociada a la exéresis del tumor primario, el diagnóstico cervical como pN+ tras el análisis anatomopatológico de los ganglios linfáticos excluye a los pacientes del estudio.

Todos los datos clínicos e histopatológicos de los pacientes así como los de mortalidad, aparición de recidivas y localización de las mismas, periodo libre

de enfermedad y tiempo de seguimiento se recogen de la Base de datos de Oncología.

La serie de 124 pacientes está integrada por 90 varones (72,6%) y 34 mujeres (27,4%). La mediana de edad es de 57 años (rango: 18 a 83 años). Un total de 62 pacientes (50%) son clasificados como estadio I (pT1N0M0) y 62 pacientes (50%) se identifican como estadio II (pT2N0M0). El seguimiento de los pacientes se ha realizado de forma mensual durante el primer año postratamiento, cada tres meses en el segundo año, de forma semestral a partir del tercer año y de forma anual a partir del quinto año. La mediana de seguimiento de la serie es de 93 meses (rango: 5 a 242 meses).

Esta serie se divide en dos subgrupos según el tipo de tratamiento cervical primario realizado. Esta división se basa en un estudio previo de nuestro grupo sobre la indicación de disección cervical electiva en estadios precoces del cáncer intraoral y las diferencias significativas encontradas en relación con las tasas de recidivas regionales y de supervivencia según el tipo de tratamiento cervical realizado.<sup>46</sup> Esta clasificación será empleada para el estudio comparativo de determinados factores:

- Pacientes con disección cervical primaria en el momento de la exéresis del tumor intraoral o *grupo I*.
- Pacientes sin disección cervical primaria o *grupo II*. Este grupo II de pacientes se clasifica como N0 tras la exploración clínica negativa del cuello y tras el estudio radiológico en el cual no se identifican adenopatías cervicales significativas (TAC y/o Ecografía).

De este modo, 81 pacientes (65,3%) pertenecen al Grupo I, mientras que 43 pacientes (34,7%) se incluyen en el Grupo II. El Grupo I está constituido por 64 varones (79%) y 17 mujeres (21%), con una mediana de edad de 56 años (rango: 28 a 79 años). Un total de 31 casos (38,3%) son clasificados como estadio I frente a 50 casos (61,7%) que son identificados como estadio II. La mediana de seguimiento de este grupo es de 95 meses (rango: 9 a 242 meses). Así mismo, el Grupo II está representado por 26 varones (60,5%) y 17 mujeres (39,5%), con una mediana de edad de 63 años (rango: 18 a 83 años). De estos 43 pacientes, 31 casos (72,1%) son identificados como estadio I frente a 12 casos (27,9%) que son registrados como estadio II. La mediana de seguimiento es de 81 meses (rango 5 a 232 meses).

La *radioterapia postoperatoria* se emplea como tratamiento adyuvante en aquellos pacientes que se considera indicado según el análisis individualizado de cada caso por el *Comité de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid*. El cumplimiento de uno de los siguientes criterios es indicación de irradiación postoperatoria:

- Tumores pobremente diferenciados.
- Afectación de los márgenes quirúrgicos de la resección.
- Presencia de infiltración tumoral perineural en el tumor primario.

Al ser una serie amplia de casos con un largo periodo de seguimiento, los criterios de indicación de radioterapia postoperatoria no han sido homogéneos, habiendo variado a lo largo del tiempo por lo que esta variable no es tomada en cuenta para los estudios comparativos de la serie. En la serie a estudio se ha

empleado la radioterapia local intraoral sin incluirse la región cervical en el campo de irradiación, según los criterios del Comité de Tumores, ya que se trata de tumores precoces con cuellos N0. Un total de 14 casos (11,5%) han recibido radioterapia local postoperatoria con una dosis total de irradiación de 57 +/-5,7 Gy. En el Grupo I 12 casos (15%) son sometidos a irradiación postoperatoria (dosis media de 56,1 +/- 5,7 Gy), frente a 2 casos (4,8%) en el Grupo II (dosis media de 62 +/- 2,8 Gy).

Al tratarse de un estudio retrospectivo de pacientes sobre muestras histológicas, no se precisa de un consentimiento informado de cada paciente para poder ser incluido en el estudio, garantizando la confidencialidad de los datos de todos pacientes.

Para el estudio comparativo de las distribuciones genotípicas de los polimorfismos C1772T y G1790A de HIF-1 $\alpha$  entre los pacientes y la población general, se selecciona una muestra de 148 voluntarios sanos que asistían como visitantes al Hospital Universitario de la Princesa. Todos ellos estaban de acuerdo con participar en el estudio en el momento de la entrevista y firmaron un consentimiento informado previo a su inclusión. Posteriormente, se obtiene 5 cc. de sangre mediante venopunción, para ulterior estudio de polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  mediante PCR .



#### 4.1.2. BASE DE DATOS

La Base de Datos de Oncología (formato dbase, MS-DOS) recoge todos los pacientes tratados de CEI desde 1980 hasta la actualidad. Esta base cuenta con una *hoja de recogida de datos* para cada paciente (*Tabla 5*).

CATEGORIAS	DATOS
Datos de filiación	Número de historia clínica Dirección Edad Sexo
Enfermedad actual	Tipo tumoral Localización tumoral Estadio clínico (TNM) Antecedentes oncológicos (lesiones premalignas, segundos tumores) Hábitos tóxicos (tabaco/alcohol) Tratamientos previos
Tratamiento primario	Fecha de la cirugía Tipo de cirugía loco-regional Tipo de reconstrucción primaria
Tratamientos reconstructivos secundarios	
Estudio anatomopatológico	Número de estudio Estadio patológico (pTNM) Márgenes quirúrgicos Espesor tumoral Afectación perineural Inflamación peritumoral
Radioterapia postoperatoria	Fecha de inicio de tratamiento Dosis total de irradiación
Recidivas	Tipo de recidiva Fecha de aparición Tratamiento de las mismas
Situación actual	Situación clínica Meses de seguimiento

*Tabla 5.* Hoja de recogida de datos para la Base de datos de oncología.

#### 4.1.3. VARIABLES CLINICO-PATOLÓGICAS

Diversas variables clínico-patológicas, seleccionadas de la Base de Datos para el presente estudio, son analizadas para el estudio de correlación y de supervivencia (*Tablas 6 y 7*).

VARIABLE	CATEGORÍA
Edad	<i>Variable continua</i>
Sexo	Varón Mujer
Disección cervical	Grupo I Grupo II
Estadio (pTNM)	I (pT1N0M0) II (pT2N0M0)
Hábitos tóxicos	Nada Tabaco Alcohol Tabaco+alcohol
Lesiones premalignas	Nada Leucoplasia Líquen plano Eritroplasia Sífilis
Localización tumoral	Lengua móvil Suelo de boca Mucosa yugal Encía Base de lengua Trígono retromolar Orofaringe Paladar duro Paladar blando
Segundos primarios	No 1 2 ó más
Recidiva loco-regional	No Si
Situación actual	Vivo Muerto por otra causa Muerto por tumor

*Tabla 6. Variables clínicas del estudio.*

VARIABLE	CATEGORÍA
Grado diferenciación (Broders)	Bien diferenciado Moderadamente diferenciado Pobremente diferenciado
Márgenes quirúrgicos	Libres Afectos
Espesor tumoral	< 2 mm ≥ 2 mm
Infiltración perineural	No Si
Inflamación peritumoral	Presente Ausente

*Tabla 7.* Variables anatomopatológicas del estudio.

#### 4.1.4. MUESTRAS HISTOLÓGICAS

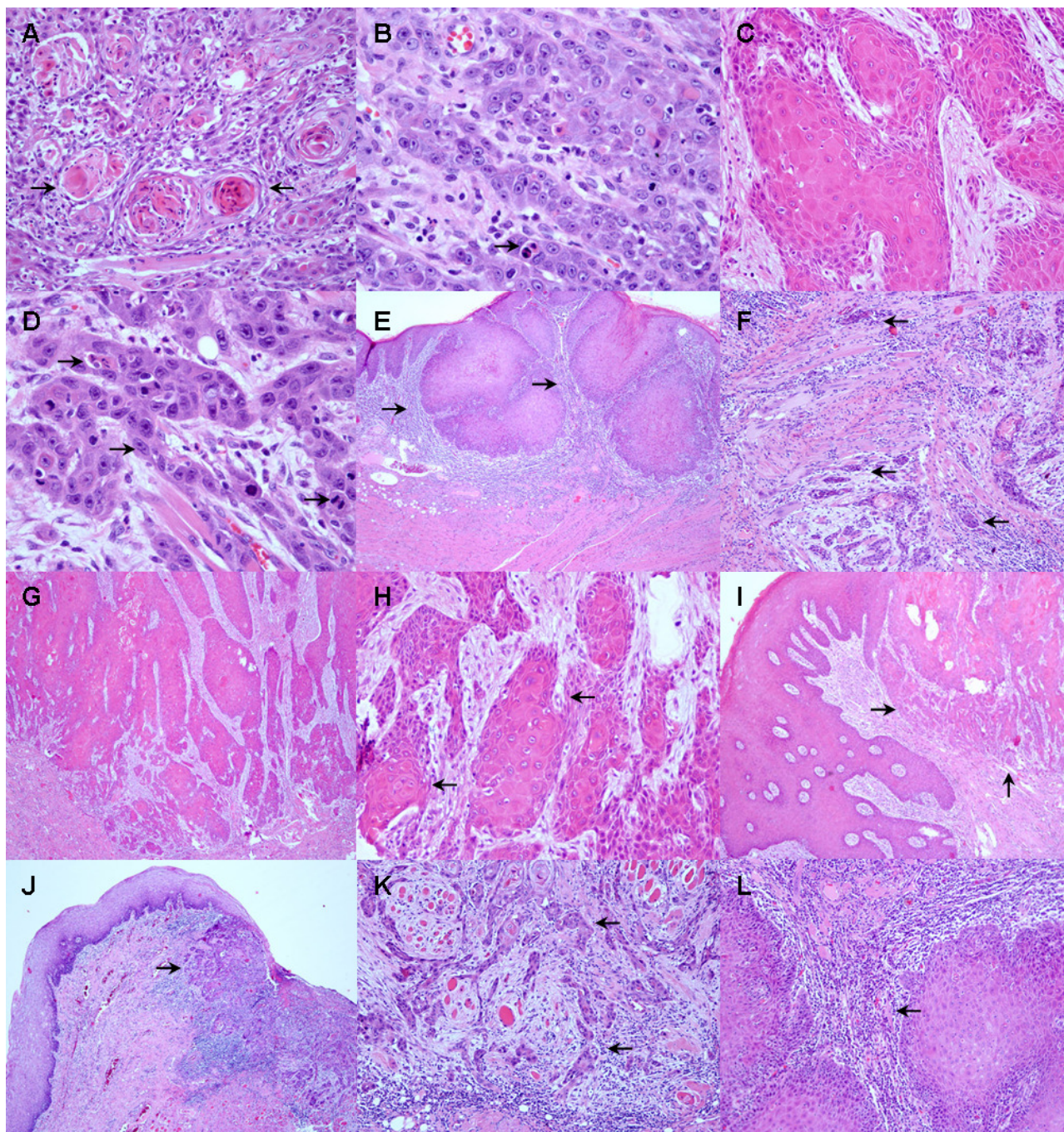
Las muestras histológicas de cada tumor primario en bloques de parafina, así como las secciones histológicas con la tinción original de Hematoxilina-Eosina, se obtienen del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid. Para el propósito del estudio se utilizan las muestras más representativas de la lesión tumoral así como muestras de tejido de mucosa oral normal como patrón de referencia.

## **4.2. MÉTODO**

### **4.2.1. HISTOLOGÍA CONVENCIONAL**

En el presente estudio se analiza el grado histológico de malignidad tumoral empleando la clasificación descrita por Anneroth en 1987.<sup>70</sup> Para el análisis de las diferentes variables de esta clasificación, se estudian los cortes de los tumores obtenidos del archivo de Anatomía Patológica que previamente han sido deparafinizados con xylol y alcoholes de gradación decreciente y teñidos mediante la técnica de HE&E convencional.

Dos investigadores (ACM, CGA) reevalúan las muestras histológicas de los pacientes analizando las diferentes características del tumor incluidas en dicha clasificación y otorgando en cada categoría la puntuación correspondiente según las observaciones de la muestra. Se obtiene un índice final sumatorio que valora el grado de agresividad tumoral y que se registra como una nueva variable para el estudio. Las diferentes categorías de la clasificación así como las puntuaciones de cada categoría se describen en la *Tabla 8*. En las *Figuras 2A a 2L* se muestran imágenes histológicas de H&E de los diferentes parámetros morfológicos de la clasificación de Anneroth a diferentes aumentos.



*Figura 2. A: Queratinización con globos córneos (H&E x20)/ B: Abundante polimorfismo nuclear. Se observa una imagen de apoptosis (flecha) (H&E x20)/ C: Escaso polimorfismo nuclear (H&E x20)/ D: Imágenes de mitosis de las células tumorales (H&E x40)/ E: Invasión de la lámina propia (H&E x4)/ F: Invasión muscular (H&E x10)/ G: Infiltración en cordones sólidos (H&E x10)/ H: Cordones sólidos a mayor aumento (H&E x20)/ I: Frente de invasión expansivo (H&E x10)/ J: Invasión en cordones o nidos pequeños (H&E x10)/ K: Invasión en cordones o nidos pequeños a mayor aumento (H&E x20)/ L: Abundante infiltración linfoplasmocitaria (H&E x20).*



PARAMETROS MORFOLOGICOS	PUNTOS			
	1	2	3	4
Grado de queratinización	Alta (>50% células)	Moderada (20-50% células)	Mínima (5-20% células)	No queratinización (0-5% células)
Polimorfismo nuclear	Escaso (>75% céls maduras)	Moderado (75-50% céls maduras)	Abundante (25-50% céls maduras)	Extremo (0-25% céls maduras)
Número de mitosis (x400)	0-1	2-3	4-5	>5
Patrón de invasión	Bordes infiltrativos bien delimitados	Infiltrativo, cordones sólidos	Pequeños nidos o cordones	Expansivo, disperso
Grado de invasión (profundidad)	Carcinoma in situ	Invasión lámina propia	Invasión muscular/ salivar/ periostio	Invasión ósea
Infiltración linfoplasmocitaria	Marcada	Moderada	Leve	Nula

*Tabla 8.* Clasificación de Anneroth. Variables incluidas en la clasificación con sus diferentes categorías.



## **4.2.2. LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL**

### **4.2.2.1. TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA**

El estudio de la linfangiogénesis se realiza mediante la técnica de inmunohistoquímica empleando un marcador específico para vasos linfáticos, el anticuerpo contra la proteína *PA2.26/podoplanina* humana, sintetizado en el “Laboratorio de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols” de Madrid por el Dr. Miguel Quintanilla y colaboradores, según lo descrito en estudios previos.<sup>123,144</sup> Este anticuerpo ha demostrado especificidad para la proteína y las formas glicosiladas de PA2.26 en estudios de transcripción/traducción y en cultivos de células humanas tras la transferencia del cDNA de PA2.26/podoplanina. El suero anti-PA2.26/podoplanina ha sido probado en diferentes tejidos humanos así como en otros tipos de tumores, demostrándose su especificidad para el endotelio linfático.<sup>144</sup> El epítipo que reconoce este antisuero no se enmascara con la fijación con formol, por lo que no es necesaria la utilización de técnicas de desenmascaramiento para la tinción, lo cual favorece la normalización de la técnica y la reproducibilidad de los resultados.

Como primer paso, las piezas histológicas son deparafinadas con xylol, son rehidratadas en alcoholes de gradación decreciente (etanol) y posteriormente son lavadas en fosfato buffer salino o PBS. La actividad de la peroxidasa endógena es bloqueada con agua oxigenada y metanol. Las secciones de tejido deparafinadas son incubadas con el suero anti-PA2.26/podoplanina a una dilución de 1/4000 a temperatura ambiente durante 60 minutos, antes y después de la pre-incubación del propio antisuero con



polipéptidos P<sub>37-51</sub> y P<sub>control</sub> como un control negativo y son entonces lavadas con TRIS pH 7. El complejo *Envision plus-peroxidasa anti-conejo* (HRP; Dako A/S, Glostrup, Dinamarca) se emplea como anticuerpo secundario. Posteriormente se revelan con diaminobecidina tetraclorhidrato y peróxido de hidrógeno, se deshidratan con etanol en gradación creciente y se lavan con xylol. Por último son montadas en medio Permout (Eukitt) (O. Kindler GMBH&Co.; Freiburg, Alemania) después de la contratinción con Hematoxilina-Eosina.

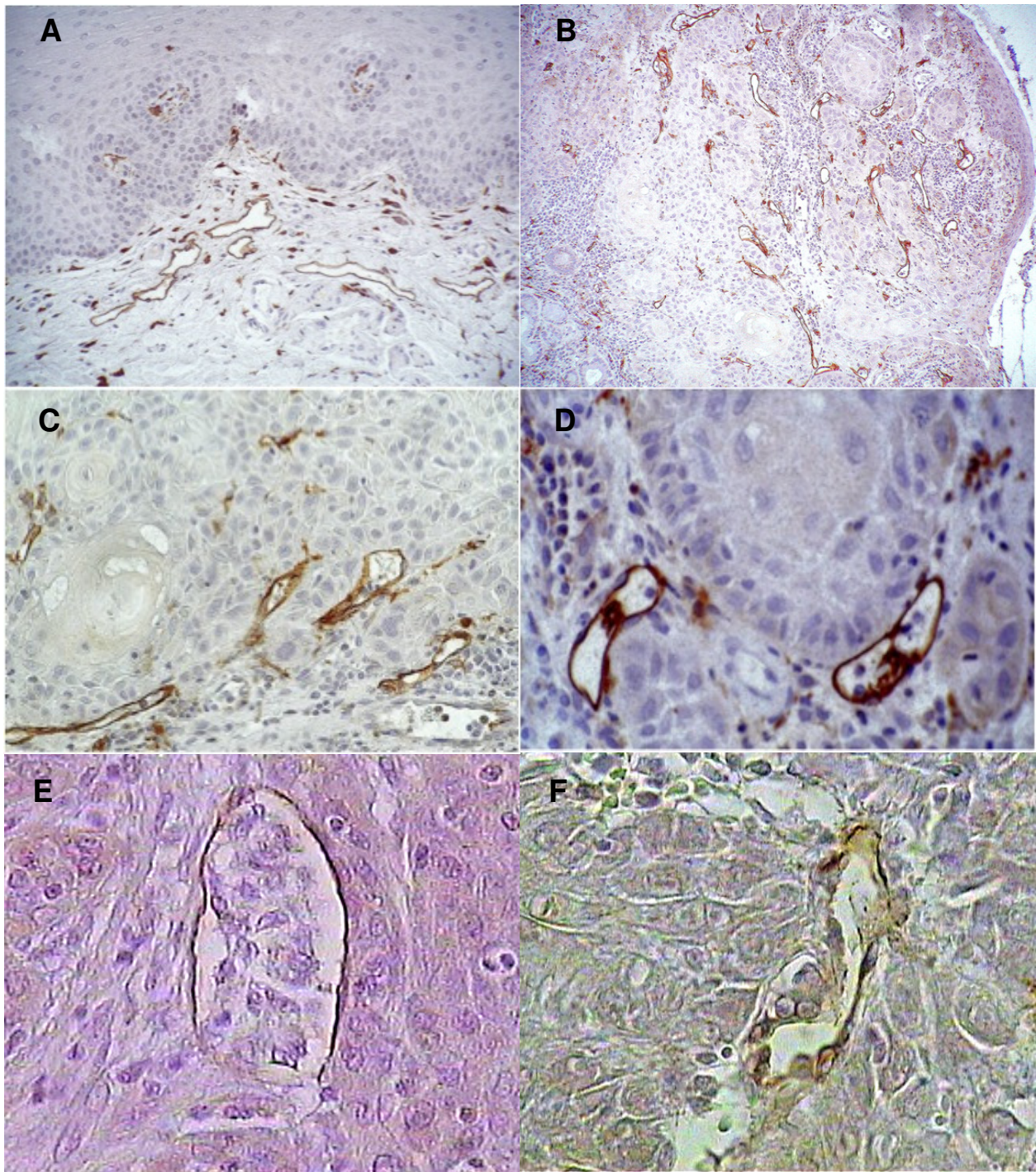
#### **4.2.2.2. EVALUACIÓN DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL**

Por cada caso de linfangiogénesis estudiado, se analizan un mínimo de dos cortes histológicos de cada pieza que incluyen todo el espesor del tumor y sus márgenes. Se utiliza como control interno de la técnica las zonas de mucosa normal donde se objetiva una rica red de vasos linfáticos marcados en la región subepitelial (*Figura 3A*). Dos investigadores (ACM, CGA) examinan cada una de las muestras histológicas, sin conocimiento previo de la evolución clínica de los casos. En los casos de no concordancia de los resultados, se reevalúan las muestras hasta obtener un consenso para la valoración final.

La *linfangiogénesis intratumoral* es objeto de análisis en este estudio, diferenciándola de la linfangiogénesis peritumoral que también es observada en casi el 100% de las muestras analizadas (*Figura 3B*). Los criterios seguidos para considerar la linfangiogénesis intratumoral como positiva han sido los siguientes:

- Presencia de vasos linfáticos iniciales marcados en el interior del estroma tumoral en íntimo contacto con las células tumorales (*Figura 3C*).
- Presencia de proliferación endotelial (*Figura 3D*).

Por tanto, se ha considerado como *linfangiogénesis positiva (LF+)* cuando se describen estos vasos linfáticos en uno o más cortes de cada pieza quirúrgica, mientras que se identifica como *linfangiogénesis negativa (LF-)* si no es posible la identificación de vasos marcados en ninguna de las muestras histológicas. En algunos casos es posible identificar la intravasación de células tumorales en el interior de estos vasos linfáticos (*Figuras 3E y F*).



*Figura 3. A: Mucosa oral normal donde se objetivan abundantes vasos linfáticos en la zona subepitelial PA2.26 positivos (H&E x4)/ B: Abundantes vasos linfáticos PA2.26 positivos en el interior del estroma tumoral (H&E x4)/ C: Intimo contacto entre las células tumorales y los vasos linfáticos iniciales (H&E x10)/ D: Imagen de proliferación endotelial en los vasos linfáticos iniciales (H&E x20)/ E y F: Intravasación de células tumorales en el interior de los neovasos (H&E x4).*



#### 4.2.3. POLIMORFISMO DE HIF-1 $\alpha$

Para el estudio de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  se emplean las muestra de los tumores obtenidas de los bloques de parafina que son sometidas a un proceso de extracción del ADN para posteriormente realizar la técnica de *Reacción en cadena de la polimerasa* y el análisis del *polimorfismo de fragmentos de restricción* o *PCR-RFLP* (*Polymerasa chain reaction-Restriction fragment length polymorphism*).

Para el estudio de estos polimorfismos en la población sana, se emplean muestras de sangre de las que se extrae el ADN mediante un *kit específico* según las indicaciones del fabricante (PureGene Kit. Gentra Systems, MN. USA) y se procesa según la técnica de PCR-RFLP.

Los pasos seguidos para el estudio de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  son los siguientes:

- Extracción de ADN.
- Amplificación mediante PCR y visualización del producto amplificado.
- Digestión con endonucleasas de restricción, separación de los fragmentos mediante electroforesis y visualización en gel de agarosa (RFLP).

#### 4.2.3.1. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DEL ADN

La extracción del ADN de las muestras deparafinizadas de tejido tumoral se realiza mediante tratamiento con calor y posterior digestión con proteinasa K. Se calientan secciones de tejido de 4µm. a 100°C durante 2 horas en Tris 50 mM y *Chélex* (resina de intercambio iónico). Se incuban las muestras con 400 µg/ml de proteinasa K a 55°C durante 2 horas y posteriormente se inactiva la proteinasa K con calor a 100°C durante 15 minutos. Los detritos celulares son sometidos a centrifugación y el sobrenadante es transferido a un tubo limpio.

El ADN de las muestras de sangre de los voluntarios sanos se extrae según las indicaciones del fabricante del kit empleado (PureGene Kit. Gentra Systems, MN. USA).

#### 4.2.3.2. AMPLIFICACIÓN CON PCR

La PCR de las muestras obtenidas se realiza utilizando los cebadores específicos descritos por *Fransen y cols.*<sup>198</sup> La PCR para la identificación del polimorfismo SNP C1772T se realiza de la siguiente manera: se amplifica 500 ng de ADN en un volumen final de reacción de 50 µl que contiene 7,5 pmol de cada cebador, 2,5 U de polimerasa Taq (Biotools B&M Labs., S.A. Madrid. España), tampón de reacción 1x, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 200 µM de desoxinucleótidos fosfato (dNTPs). Los cebadores sentido y antisentido específicos se adquieren de Metabion International AG (Martinsried. Alemania) y el resto de agentes para la PCR de Biotools B&M Labs. Para la reacción de amplificación se utilizó un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (applied

Biosystems. Foster City. CA. USA). Los ciclos de temperatura fueron los siguientes: un ciclo inicial desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, se sigue de otros 35 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 minuto cada uno), apareamiento de los cebadores (55°C durante 1 minuto), una elongación con los dNTPs (72°C durante 1 minuto) y una elongación final a 72°C durante 7 minutos. La detección mediante PCR del polimorfismo G1790A se lleva a cabo reproduciendo las condiciones descritas por *Fransen y cols.*<sup>198</sup> Los productos amplificados de 147 pb (C1772T) y 255 pb (G1790A) se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% y 2% respectivamente.

#### **4.2.3.3. RFLP**

Diez microlitros (10 µl) de los productos de la PCR se digieren durante toda la noche con enzimas de restricción específicas. La enzima de restricción Bsc4I se emplea para la identificación del polimorfismo C1772T, ya que la sustitución C/T afecta a su secuencia de reconocimiento (CCN5//N2GG) de forma que cuando ésta intacta se obtiene un fragmento de 131 pb y otro de 19 (que no se visualiza en el gel), mientras que en los casos de polimorfismo se obtiene el fragmento no digerido de 147 pb (*Figura 4A*). El producto amplificado se incuba con 4 unidades de la endonucleasa de restricción Bsc4I (New England Biolabs/Bitools B&M Labs., S.A. Madrid. España) durante toda la noche a 55°C y los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (Conda Laboratories, Madrid. España). Por o tanto, los fragmentos generados son: fragmentos de 131 pb y 19 pb en la variante normal

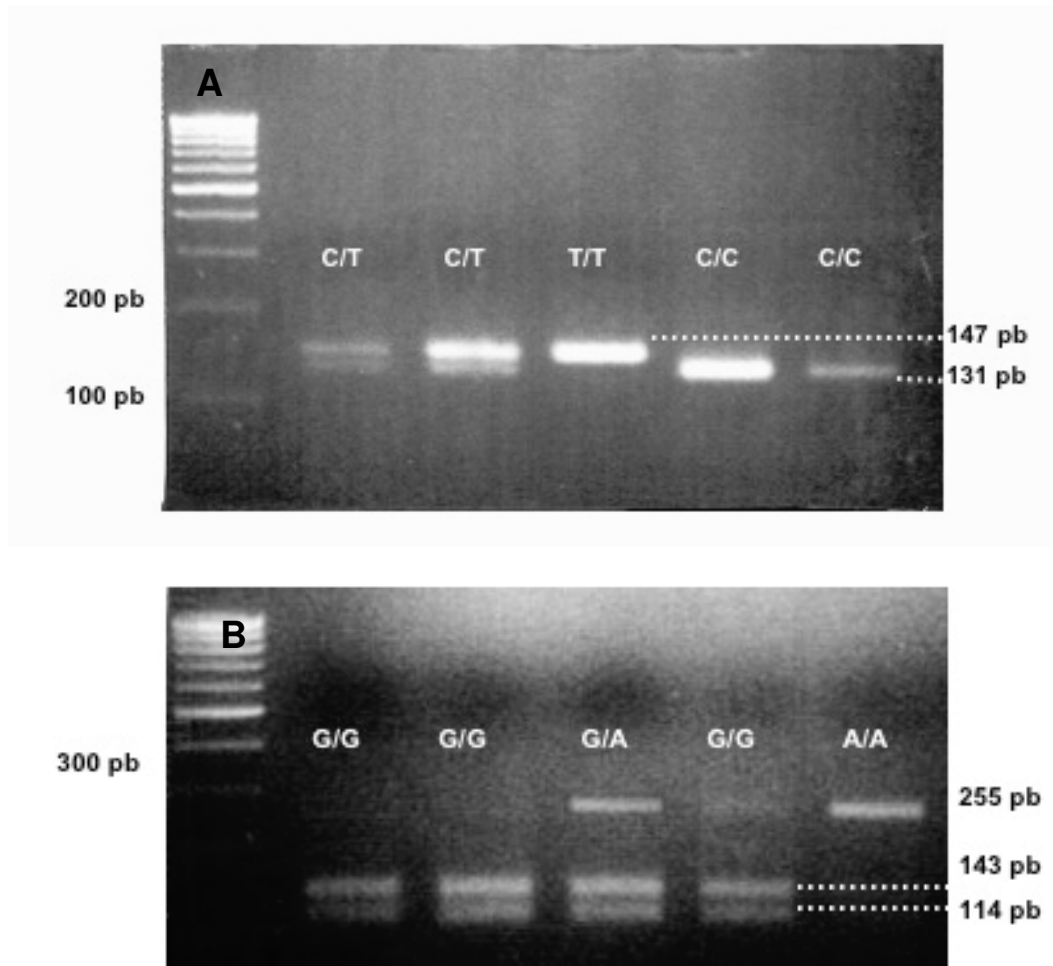
homocigota, fragmentos de 147 pb en la variante polimórfica homocigota y todos los fragmentos en la variante heterocigota.

El genotipo del polimorfismo G1790A se determina empleando la enzima de restricción AclI (New England Biolabs/IZASA., S.A. Madrid. España), cuya secuencia de reconocimiento es .5'C//CGC3'. En este caso el producto amplificado se incuba con 8 U de enzima a una temperatura de digestión de 37°C, generándose los fragmentos siguientes: fragmentos de 143 pb y 114 pb (variante normal homocigota), fragmentos de 255 pb (variante polimórfica homocigota) o los todos los fragmentos (variante heterocigota) (*Figura 4B*). Los productos de digestión se visualizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

#### **4.2.3.4. EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO**

Una vez realizada la técnica de PCR-RFLP de cada muestra, tanto de los pacientes con CEI como los voluntarios sanos, se registra el resultado genotípico de cada uno de los polimorfismos a estudio en una hoja de recogida de datos. De este modo, los datos del polimorfismo G1790A se recogen en tres categorías: variante normal homocigota o G/G, variante polimórfica homocigota o A/A y variante heterocigota o G/A. En relación con los resultados descriptivos de este polimorfismo, muy pocos paciente (<5%) presentan la variante A/A.





*Figura 4. A:* Bandas generadas por electroforesis en gel de agarosa al 2,5% para el polimorfismo C1772T. Se observa una banda de 131 pb para el alelo normal C y una banda de 147 pb para el alelo polimórfico T. *B:* Bandas generadas por electroforesis en gel de agarosa al 2% para el polimorfismo G1790A. Se observa una banda de 143 pb y otra de 114 pb para el alelo normal G y una única banda de 255 pb para el alelo polimórfico A.



Para facilitar el estudio estadístico analítico de esta variable, se agrupa la misma en dos categorías: variante normal homocigota (G/G) y variante polimórfica (A/A y G/A), que incluye ambas variantes homocigotas y heterocigota para el polimorfismo G1790A.

Para el polimorfismo C1772T se registran igualmente tres categorías: variante normal homocigota o C/C, variante polimórfica homocigota o T/T y variante heterocigota o C/T. De forma similar al anterior polimorfismo y para facilitar el estudio estadístico analítico, se va a agrupar esta variable en dos categorías: variante normal homocigota (C/C) y variante polimórfica (T/T y C/T).

En el análisis estadístico se comparan las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos de los pacientes a estudio con los voluntarios sanos. Así mismo, en el grupo de pacientes se comparan la relación entre los polimorfismos a estudio y diferentes variables clínico-patológicas, así como su correlación con la supervivencia causa-específica y la supervivencia libre de enfermedad. En estudios previos de nuestro grupo (resultados en proceso de publicación), se analiza la *Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg* para las distribuciones genotípicas de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  en la población de voluntarios sanos. Se objetiva que esta población no está en equilibrio para el polimorfismo C1772T pero que si se cumple dicho equilibrio para el polimorfismo G1790A. Los datos son tratados de manera que se asegure la confidencialidad tanto de los voluntarios sanos como de los pacientes.

#### **4.2.4. MÉTODO ESTADÍSTICO**

##### **4.2.4.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA**

Como análisis inicial, se realiza un estudio descriptivo de frecuencias de la serie en relación con las variables clínico-patológicas tanto en la serie global como en los Grupo I y II de pacientes. Se describe la distribución por frecuencias tanto de la linfangiogénesis intratumoral como del índice de Anneroth. Se estudia la distribución genotípica de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  en los voluntarios sanos y el grupo de pacientes.

Así mismo, se realiza un análisis descriptivo en el grupo de pacientes que presentan segundas neoplasias. Para definir un segundo tumor primario se emplean los criterios de Warren y Gates:<sup>199</sup>

- El segundo tumor debe ser histológicamente maligno.
- El segundo tumor debe ser una masa distinta del tumor primario a estudio, separado de éste por al menos 2 cm de tejido sano.
- La posibilidad de que el segundo tumor sea una metástasis debe ser histológicamente excluida.
- Las lesiones pulmonares secundarias deben de ser solitarias e histológicamente distintas del tumor primario a estudio.

A estos criterios se añaden dos modificaciones para el presente estudio:

- En segundos tumores intraorales, se considera como una segunda neoplasia cuando han pasado al menos 5 años libre de enfermedad desde el

tratamiento del tumor primario a estudio o el tumor secundario es previo pero han pasado más de 5 años hasta la aparición del primario.

- El estadio tumoral del tumor primario debe ser N0 en el momento del diagnóstico para descartar la posibilidad de enfermedad diseminada.

Para el estudio de las segundas neoplasias se recogen los siguientes datos: cronología de aparición (previa, sincrónica o posterior al tumor primario), histología, localización, mortalidad por el segundo tumor, antecedentes de hábitos tóxicos o lesiones premalignas, características del tumor primario a estudio y polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  en estos pacientes.

#### **4.2.4.2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA**

En el estudio comparativo se van a analizar los distintos factores pronósticos clínico-patológicos definidos previamente en el examen descriptivo. Con el propósito de facilitar el análisis comparativo, determinadas *variables* cualitativas y cuantitativas han sido convertidas en variables dicotómicas (*variable transformada*) según las modificaciones descritas en la *Tabla 9*. De igual manera, tanto el índice de Anneroth como las diferentes variables de la clasificación son transformados en dos categorías para facilitar el estudio comparativo.

VARIABLE	VARIABLE (TRANSFORMADA)	CATEGORIAS
EDAD (variable cuantitativa)	EDAD (TRANSFORMADA)	<= 40 años > 40 años
HÁBITO TOXICO	HABITO TÓXICO (TRANSFORMADA)	Si No
LESIONES PREMALIGNAS	LESIONES PREMALIGNAS (TRANSFORMADA)	Si No
LOCALIZACIÓN (localizaciones más prevalentes)	LOCALIZACIÓN (TRANSFORMADA)	Lengua móvil Suelo de boca
SEGUNDAS NEOPLASIAS	SEGUNDAS NEOPLASIAS (TRANSFORMADA)	Si No
SITUACIÓN ACTUAL	SITUACIÓN ACTUAL (TRANSFORMADA)	Vivo/ muerto por otra causa Muerto por tumor
ÍNDICE ANNEROTH (variable cuantitativa)	ÍNDICE ANNEROTH (TRANSFORMADA)	Valor I: Anneroth <=13 Valor II: Anneroth >13
GRADO QUERATINIZACIÓN	GRADO QUERATINIZACIÓN (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4
POLIMORFISMO NUCLEAR	POLIMORFISMO NUCLEAR (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4
NUMERO MITOSIS	NUMERO MITOSIS (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4
PATRÓN INVASIÓN	PATRÓN INVASIÓN (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4
GRADO INVASIÓN	GRADO INVASIÓN (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4
INFILTRACIÓN LINFOPLASMOCITARIA	INFILTRACIÓN LINFOPLASMOCITARIA (TRANSFORMADA)	Valor I: puntuación 1 y 2 Valor II: puntuación 3 y 4

*Tabla 9. Variables transformadas del estudio.*

La asociación entre las diferentes variables del estudio se analiza mediante el *Test de la Chi cuadrado de Pearson con corrección de Yates*. Cuando las condiciones para el Test de la Chi cuadrado no se cumplen, se emplea el *Test exacto de Fisher* para el estudio de correlación.

Para el análisis de supervivencia se considera la *supervivencia global* y la *supervivencia causa-específica*. La supervivencia global se define como el periodo de tiempo desde el tratamiento del tumor primario hasta el fallecimiento del paciente, bien por causa tumoral o bien por otra causa distinta del tumor primario. Se define como supervivencia causa-específica al periodo desde el tratamiento primario del tumor hasta el fallecimiento del paciente por el tumor primario. Se establece un periodo de seguimiento mínimo desde la cirugía hasta el fallecimiento de 1 mes, considerando como mortalidad peri-operatoria la sucedida durante este primer mes. Así mismo, se emplea como medida del pronóstico la *supervivencia libre de enfermedad*, definida como el periodo acaecido entre la intervención quirúrgica del tumor primario y la aparición de la primera recidiva o hasta el momento del último seguimiento si no han surgido recidivas. Así mismo, se establece un periodo libre de enfermedad mínimo de 1 mes, considerando la aparición de una lesión durante este primer mes como persistencia de la enfermedad tumoral.

En el *análisis invariante* de supervivencia global y causa-específica así como de supervivencia libre de enfermedad se emplean las *Curvas de Kaplan-Meier*. Para el *Test de Mantel-Haenszel o Log-Rank*, se analiza la supervivencia causa-específica y la supervivencia libre de enfermedad con diferentes variables del estudio. En el grupo de segundas neoplasias, se considera la supervivencia acumulada tanto del tumor primario como de los segundos tumores primarios para medir el impacto de ambos en la supervivencia de estos pacientes. El nivel de significación considerado en

todos los tests es de  $p < 0,05$ . Todo el análisis se lleva a cabo mediante el programa estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.).



## **RESULTADOS**



## 5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

### 5.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se estudia la distribución de las diferentes variables clínico-patológicas tanto en la serie global de pacientes como en los Grupos I y II descritos previamente.

Se observa una frecuencia de hábitos tóxicos en la serie global de pacientes (fumadores y/o bebedores) del 65,3%. La presencia de lesiones premalignas como antecedente se identifica en un 29,8%. Además, en 26 pacientes (21%) se identifican segundos tumores primarios. Los datos de frecuencias sobre los diferentes antecedentes clínicos se muestran en la *Tabla 10*.

Las localizaciones más frecuentes de los carcinomas en esta serie son la lengua móvil (62,2% en la serie global) y el suelo de boca (25,8% en la serie global), siendo mucho más infrecuentes el resto de localizaciones. Las diferentes *localizaciones* del tumor primario se describen en la *Tabla 11*.

<b>HÁBITO TÓXICO</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n= 81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
No hábitos tóxicos	43 (34,7)	24 (29,6)	19 (44,2)
Si hábitos tóxicos	81 (65,3)	57 (70,4)	24 (55,8)
- Tabaco	34 (27,4)	21 (25,9)	13 (30,2)
- Alcohol	1 (0,8)	0	1 (2,3)
- Tabaco + alcohol	46 (37,1)	36 (44,5)	10 (23,3)
<b>LESIONES PREMALIGNAS</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
No les premalignas	87 (70,2)	62 (76,5)	25 (58,1)
Si les premalignas	37 (29,8)	19 (23,5)	18 (41,9)
- Leucoplasia	8 (6,5)	4 (4,9)	4 (9,3)
- Eritroplasia	5 (4)	3 (3,7)	2 (4,7)
- Liquen plano	23 (18,5)	11 (13,6)	12 (27,9)
- Sífilis	1 (0,8)	1 (1,3)	
<b>SEGUNDAS NEOPLASIAS</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
No segundas neoplasias	98 (79)	67 (82,7)	31 (72,1)
Si segundas neoplasias	26 (21)	14 (17,3)	12 (27,9)
- Una	23 (18,5)	12 (14,8)	11 (25,6)
- Dos o más	3 (2,5)	2 (2,5)	1 (2,3)

*Tabla 10.* Antecedentes clínicos en la serie global y los Grupos I y II.

<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
Lengua móvil	77 (62,2)	44 (54,3)	33 (76,8)
Suelo de boca	32 (25,8)	25 (30,8)	7 (16,3)
Mucosa yugal	1 (0,8)	0	1 (2,3)
Encía	3 (2,4)	2 (2,5)	1 (2,3)
Base de lengua	3 (2,4)	3 (3,7)	0
Trígono retromolar	3 (2,4)	3 (3,7)	0
Orofaringe	3 (2,4)	2 (2,5)	1 (2,3)
Paladar blando	2 (1,6)	2 (2,5)	0

*Tabla 11.* Localización del tumor primario en la serie global y los Grupos I y II.

De los 124 pacientes de la serie que han sido tratados mediante cirugía local, ésta se asocia a algún tipo de resección ósea (principalmente mandibulectomías marginales) en 15 casos (12,1%), 14 pacientes (17,3%) en el Grupo I y 1 paciente (2,3%) en el Grupo II. En el Grupo I, el tipo de disección cervical empleada varía dependiendo de cada caso concreto, predominando la disección cervical funcional o disección radical modificada tipo III frente a la disección radical clásica (*Tabla 12*).

TIPO DE DISECCIÓN CERVICAL	CASOS (%) n=81
Disección cervical funcional (DCF) homolateral	50 (61,7)
DCF bilateral	26 (32,2)
Disección cervical radical (DCR) homolateral	1 (1,2)
Disección cervical supraomohioidea	1 (1,2)
Otras disecciones cervicales radicales modificadas (Tipo I y II)	3 (3,7)

*Tabla 12.* Tipos de disección cervical empleados en el Grupo I de pacientes.

Para el cierre primario del defecto de la cavidad oral tras la resección tumoral, se emplean diversas *técnicas reconstructivas* con diferentes tipos de colgajos locales o a distancia. Los diferentes tipos de reconstrucción se describen en la *Tabla 13*.

TIPO DE RECONSTRUCCIÓN	CASOS (%)		
Categorías	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Cierre directo	59 (47,6)	40 (49,4)	19 (44,2)
Vaporización con Laser CO <sub>2</sub>	34 (27,4)	13 (16,1)	21 (48,9)
Colgajo microvascularizado	11 (8,9)	11 (13,6)	0
Injerto Libre	7 (5,7)	7 (8,6)	0
Colgajo pediculado nasogeniano	3 (2,4)	2 (2,5)	1 (2,3)
Colgajo de Bola de Bichat	3 (2,4)	2 (2,5)	1 (2,3)
Colgajo miocutáneo de pectoral mayor	2 (1,6)	2 (2,5)	0
Colgajo miofascial temporal	1 (0,8)	1 (1,2)	0
Colgajo local de rotación	1 (0,8)	1 (1,2)	0
Injerto óseo cresta ilíaca	1 (0,8)	1 (1,2)	0
Otros colgajos pediculados	1 (0,8)	0	1 (2,3)
Otros colgajos locales	1 (0,8)	1 (1,2)	0

*Tabla 13.* Tipos de reconstrucción primaria tras la resección tumoral en la serie global y Grupos I y II.

En cuanto a factores histopatológicos como el grado histológico de diferenciación (clasificación de Broders), en la serie global predominan los carcinomas moderadamente diferenciados (52%) frente a los bien diferenciados (38,2%) y los pobremente diferenciados (9,8%). Así mismo predominan los tumores mayores o iguales a 2 mm. de espesor (82,8%). En la serie global se observa un 13% de pacientes con afectación de los márgenes quirúrgicos. Las frecuencias de estas variables así como de presencia de infiltración perineural y de inflamación peritumoral, se describen en la *Tabla 14*.

<b>DIFERENCIACIÓN HISTOLÓGICA</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
Carcinoma bien diferenciado	47 (38,2)	30 (37)	17 (40,5)
Carcinoma moderadamente diferenciado	64 (52)	44 (54,3)	20 (47,6)
Carcinoma pobremente diferenciado	12 (9,8)	7 (8,7)	5 (11,9)
No definido	1	0	1
<b>ESPESOR TUMORAL</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
> 2 mm	20 (17,2)	10 (12,8)	10 (26,3)
> ó = 2 mm	96 (82,8)	68 (87,2)	28 (73,7)
No definido	8	3	5
<b>MÁRGENES QUIRURGICOS</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
Libres	107 (87)	70 (90)	35 (81,4)
Afectos	16 (13)	10 (10)	8 (18,6)
No definidos	1	1	0
<b>INFILTRACIÓN PERINEURAL</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
No	77 (81,9)	48 (78,7)	29 (87,9)
Si	17 (18,1)	13 (21,3)	4 (12,1)
No definida	30	20	10
<b>INFLAMACIÓN PERITUMORAL</b>	<b>CASOS (%)</b>		
<b>Categorías</b>	<b>Serie global (n=124)</b>	<b>Grupo I (n=81)</b>	<b>Grupo II (n=43)</b>
No	15 (20)	30 (69,8)	30 (93,8)
Si	60 (80)	13 (30,2)	2 (6,2)
No definida	49	38	11

*Tabla 14. Variables histopatológicas en la serie global y Grupos I y II.*

A lo largo del periodo de seguimiento 33 casos (26,6%) han presentado *recidivas loco-regionales* en la serie global con un *periodo libre de enfermedad* de 68 meses (rango: 2 a 232 meses). De estas recidivas, 15 casos (18,5) se han observado en el Grupo I (periodo libre de enfermedad: 88 meses; rango: 2 a 194 meses) y 18 casos (41,9%) se han observado en el Grupo II (periodo libre de enfermedad: 41 meses; rango 2 a 232 meses). Los diferentes tipos de recidivas se representan en la *Tabla 15*. Se observa que en el Grupo I de pacientes un 54,6% son recidivas locales y un 45,4% recidivas ganglionares, mientras que en el Grupo II un 50% son recidivas locales y un 50% ganglionares.

TIPO DE RECIDIVA	CASOS (%)		
Categorías	Serie global (n=33)	Grupo I (n=15)	Grupo II (n=18)
Local	18 (54,6)	9 (60)	9 (50)
Cervical homolateral	7 (21,2)	1 (6,7)	6 (33,3)
Cervical contralateral	4 (12,1)	3 (20)	1 (5,6)
Lococervical	4 (12,1)	2 (13,3)	2 (11,1)

*Tabla 15.* Tipo de recidiva loco-regional en la serie global y los Grupos I y II.

En la serie global, al final del periodo de seguimiento permanecen vivos un total de 92 casos (74,2%), fallecen por causa tumoral 13 casos (9,7%) y fallecen por otra causa 20 casos (16,1%). En el Grupo I fallecen por causa tumoral 7 pacientes (8,6%), mientras que en el Grupo II fallecen 5 pacientes (11,6%).



### 5.1.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA CLASIFICACIÓN DE ANNEROTH

El análisis anatomopatológico de las diferentes variables incluidas en la clasificación de Anneroth permite la obtención de un índice sumatorio (valor mínimo 6 y máximo 24) que sirve para identificar la agresividad biológica tumoral y el pronóstico de los diferentes tipos de tumores.

El índice de Anneroth medio de la serie global es de 13,4  $\pm$  2,3, mientras que en el Grupo I es de 14  $\pm$  2 y en el Grupo II de 13  $\pm$  2. Así mismo, 58 pacientes (50,4%) de la serie global presentan un índice  $\leq$  13 puntos y 57 pacientes (49,6%) un índice  $>$  13 puntos. En el Grupo I, 33 pacientes (45,8%) presentan un índice  $\leq$  13 y 39 pacientes (54,2%)  $>$  13 puntos, mientras que en el Grupo II 25 pacientes (58,1%) presentan un índice  $\leq$  13 y 18 pacientes (41,9%)  $>$  13 puntos.

La distribución de las diferentes variables en la serie global y los Grupos I y II se muestran en la *Tabla 16*.

GRADO DE QUERATINIZACIÓN	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Alta (1)	21 (18,3)	10 (13,9)	11 (25,6)
Moderada (2)	21 (18,3)	16 (22,2)	5 (11,6)
Mínima (3)	28 (24,3)	20 (27,8)	8 (18,6)
No queratinización (4)	45 (39,1)	26 (36,1)	19 (44,2)
No definido	9	9	0
POLIMORFISMO NUCLEAR	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Escaso (1)	31 (27)	19 (26,4)	12 (27,9)
Moderado (2)	61 (53)	36 (50)	25 (58,1)
Abundante (3)	21 (18,3)	16 (22,2)	5 (11,6)
Extremo (4)	2 (1,7)	1 (1,4)	1 (2,4)
No definido	9	9	0
MITOSIS	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
0-1 (1)	71 (61,7)	43 (59,7)	28 (65,1)
2-3 (2)	33 (28,7)	21 (29,2)	12 (27,9)
4-5 (3)	8 (7)	5 (6,9)	3 (7)
>5 (4)	3 (2,6)	3 (4,2)	0
No definido	9	9	0
MODO DE INVASIÓN	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Bordes definidos (1)	4 (3,5)	1 (1,4)	3 (7)
Infiltrativo/ cordones sólidos (2)	44 (38,3)	29 (40,3)	15 (34,9)
Pequeños nidos o cordones (3)	53 (46,1)	34 (47,2)	19 (44,2)
Expansivo/disperso (4)	14 (12,1)	8 (11,1)	6 (14)
No definido	9	9	0
GRADO DE INVASIÓN	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Lámina propia (2)	55 (47,8)	29 (40,3)	26 (60,5)
Muscular/ glándula/periostio (3)	60 (52,2)	43 (59,7)	17 (39,5)
No definido	9	9	0
INFILTRACIÓN LINFOPLASMOCITARIA	CASOS (%)		
Categorías (puntuación)	Serie global (n=124)	Grupo I (n=81)	Grupo II (n=43)
Marcada (1)	53 (46,1)	31 (43,1)	22 (51,2)
Moderada (2)	24 (20,8)	15 (20,8)	9 (20,9)
Leve (3)	31 (27)	22 (30,6)	9 (20,9)
No infiltración (4)	7 (6,1)	4 (5,5)	3 (7)
No definido	9	9	0

Tabla 16. Frecuencias de las variables incluidas en la clasificación de Anneroth.

### 5.1.3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL

En las muestras histológicas de mucosa oral normal estudiadas como control de la técnica se identifican numerosos vasos linfáticos PA2.26/podoplanina positivos en la submucosa, de tamaño irregular y compuestos por una fina pared que muestra una inmunotinción regular a lo largo de todo su endotelio. En contraste con estos vasos, los vasos sanguíneos localizados en áreas adyacentes muestran inmunotinción negativa al anticuerpo PA2.26/podoplanina. En las muestras obtenidas del tumor primario, estos vasos linfáticos se localizan en el interior del estroma tumoral y en íntimo contacto con las células neoplásicas, predominando en el frente de avance tumoral.

Se analiza la linfangiogénesis intratumoral en 122 casos del total de la serie. Se identifica la presencia de *linfangiogénesis intratumoral* (LF+) en 73 casos (59,8%), mientras que 49 casos (40,2%) presentan LF-. En 9 casos se observa la *intravasación de las células tumorales* en el interior de estos neovasos, lo que avala el papel activo de la linfangiogénesis en la progresión tumoral.

En el Grupo I de pacientes se identifican 49 casos (62%) LF+ y 30 casos (38%) LF-, mientras que en el Grupo II se identifican 24 casos (55,8%) LF+ y 19 casos (44,2%) LF-.

#### 5.1.4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL POLIMORFISMO DE HIF-1 $\alpha$

Para el análisis de los polimorfismos C1772T y G1790A de HIF-1 $\alpha$ , se estudian 72 pacientes del total de la serie (49 varones y 23 mujeres). Tras la realización de las técnicas de PCR-RFLP, el polimorfismo C1772T es finalmente estudiado en 69 casos, mientras que el polimorfismo G1790A se analiza en 63 casos. En el grupo de voluntarios sanos, se obtienen resultados sobre el genotipo C1772T en los 148 casos, mientras que el genotipo de G1790A se recoge en 139 casos. Los resultados descriptivos del grupo de pacientes y de la muestra de población sana se resumen en la *Tabla 17*. Se observa un genotipo homocigoto para el alelo T en los voluntarios sanos de 5,4% frente a 10,1% en el grupo de pacientes. El alelo A sólo se detecta en un 6,5% de la población sana sin encontrarse ningún voluntario homocigoto para dicho alelo.

CONTROLES/PACIENTES	C1772T (%)			G1790A (%)		
	C/C	C/T	T/T	G/G	G/A	A/A
Voluntarios sanos	113 (76,4)	27 (18,2)	8 (5,4)	130 (93,5)	9 (6,5)	0
Pacientes	56 (81,2)	6 (8,7)	7 (10,1)	38 (60,3)	22 (34,9)	3 (4,8)

*Tabla 17.* Resultados descriptivos de los polimorfismos C1772T y G1790A.

## **5.2. ANÁLISIS COMPARATIVO**

### **5.2.1. ANÁLISIS DE LAS DIFERENTES VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS**

#### **5.2.1.1. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA**

Se estudia la posible asociación de las diferentes variables clínico-patológicas descritas previamente con las recidivas loco-regionales. Se observa una asociación estadísticamente significativa con el tipo de tratamiento primario cervical, de modo que los pacientes sin tratamiento inicial del cuello (Grupo II) presentan un índice de recidivas del 39,5% frente a un 18,5% en el grupo de pacientes con disección cervical (Grupo I) ( $p < 0,01$ ). Los pacientes con segundos tumores primarios presentan una tendencia mayor al desarrollo de recidivas (42,3% en los pacientes con segundos primarios frente a 22,4% en los pacientes sin segundos primarios;  $p = 0,04$ ). No se encuentra una asociación entre las recidivas y el resto de variables clínico-patológicas. Los datos se muestran en la *Tabla 18*.

En el análisis de supervivencia causa-específica, la única variable significativa es el grado de diferenciación histológica de modo que los pacientes con tumores moderadamente diferenciados fallecen sólo un 3,1% por causa tumoral frente a un 17% y un 16,7% para los tumores bien diferenciados y los pobremente diferenciados respectivamente ( $p = 0,03$ ) (*Tabla 19*).

VARIABLE /categorías	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
<b>Sexo</b> Hombre Mujer	65 (72,2) 26 (76,5)	25 (27,8) 8 (23,5)	0,6
<b>Edad</b> <=40 >40	8 (72,7) 83 (73,5)	3 (27,3) 30 (26,5)	0,6
<b>Hábitos Tóxicos</b> No Si	32 (74,4) 59 (72,8)	11 (25,6) 22 (27,2)	0,8
<b>Lesiones premalignas</b> No Si	64 (73,6) 27 (73)	23 (26,4) 10 (27)	0,9
<b>Segundas neoplasias</b> No Si	76 (77,6) 15 (57,7)	22 (22,4) 11 (42,3)	<b>0,04</b>
<b>Localización</b> Lengua Suelo de boca	58 (75,3) 22 (68,8)	19 (24,7) 10 (31,2)	0,4
<b>Estadio tumoral</b> I (pT1N0M0) II (pT2N0M0)	43 (69,4) 48 (77,4)	19 (30,6) 14 (22,6)	0,3
<b>Dissección cervical</b> No Si	25 (58,1) 66 (81,5)	18 (41,9) 15 (18,5)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Diferenciación histológica</b> Ca bien diferenciado Ca moderadamente diferenciado Ca pobremente diferenciado	34 (72,3) 49 (76,6) 8 (66,7)	13 (27,7) 15 (23,4) 4 (33,3)	0,7
<b>Márgenes quirúrgicos</b> Correctos Afectos	80 (74,8) 10 (62,5)	27 (25,2) 6 (37,5)	0,3
<b>Espesor tumoral</b> <=2 mm >2 mm	17 (85) 68 (70,8)	3 (15) 28 (29,2)	0,1
<b>Infiltración perineural</b> No Si	60 (77,9) 13 (76,5)	17 (22,1) 4 (23,5)	0,5
<b>Inflamación peritumoral</b> No Si	46 (76,7) 12 (80)	14 (23,3) 3 (20)	0,5

*Tabla 18.* Asociación entre las recidivas y las diferentes variables clínico-patológicas en la serie global.

VARIABLE /categorías	SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	
<b>Sexo</b> Hombre Mujer	80 (88,9) 32 (94,1)	10 (11,1) 2 (5,9)	0,3
<b>Edad</b> <=40 >40	10 (90,9) 102 (90,3)	1 (9,1) 11 (9,7)	0,7
<b>Hábitos Tóxicos</b> No Si	38 (88,4) 74 (91,4)	5 (11,6) 7 (8,6)	0,5
<b>Lesiones premalignas</b> No Si	78 (89,7) 34 (91,9)	9 (10,3) 3 (8,1)	0,4
<b>Segundas neoplasias</b> No Si	89 (90,8) 23 (88,5)	9 (9,2) 3 (11,5)	0,4
<b>Localización</b> Lengua Suelo de boca	68 (88,3) 29 (90,6)	9 (11,7) 3 (9,4)	0,5
<b>Estadio tumoral</b> I (pT1N0M0) II (pT2N0M0)	57 (91,9) 55 (88,7)	5 (8,1) 7 (11,3)	0,3
<b>Dissección cervical</b> No Si	38 (88,4) 74 (91,4)	7 (11,6) 5 (8,6)	0,5
<b>Diferenciación histológica</b> Ca bien diferenciado Ca moderadamente diferenciado Ca pobremente diferenciado	39 (83) 62 (96,9) 10 (83,3)	8 (17) 2 (3,1) 2 (16,7)	<b>0,03</b>
<b>Márgenes quirúrgicos</b> Correctos Afectos	97 (90,7) 14 (87,5)	10 (9,3) 2 (12,5)	0,4
<b>Espesor tumoral</b> <=2 mm >2 mm	19 (95) 86 (89,6)	1 (5) 10 (10,4)	0,3
<b>Infiltración perineural</b> No Si	72 (93,5) 14 (82,4)	5 (6,5) 3 (17,6)	0,1
<b>Inflamación peritumoral</b> No Si	15 (100) 55 (91,7)	0 (0) 5 (8,3)	0,3

*Tabla 19.* Asociación entre la supervivencia causa-específica y las variables clínico-patológicas en la serie global.

En función de la correlación encontrada con las recidivas loco-regionales y el tipo de tratamiento cervical realizado, se analiza la distribución de las distintas variables clínico-patológicas para ver si existen diferencias significativas entre los dos Grupos I y II.

Se encuentra una diferencia significativa en la distribución por sexos, de manera que en el Grupo II existe un mayor porcentaje de mujeres (39,5%) frente al Grupo I (21%) ( $p=0,02$ ). Así mismo, existe una mayor tendencia a presentar lesiones premalignas en este Grupo II, con una frecuencia del 41,9% frente a un 23,5% en el Grupo I ( $p=0,03$ ). En el Grupo II se localizan más tumores de lengua móvil (82,5% frente a 63,8%;  $p=0,03$ ) mientras que en el Grupo I son más frecuentes de forma significativa los tumores localizados en el suelo de boca (36,5% frente a 17,5%;  $p=0,03$ ). Los pT1 son más comunes en el Grupo II (72,1% frente a 38,6%;  $p<0,01$ ). También existen diferencias de distribución en relación con la inflamación peritumoral de modo que los tumores del Grupo I presentan menor tendencia a tener inflamación que los del Grupo II (69,8% frente a 93,8%;  $p<0,01$ ). Los resultados de distribución de las diferentes variables clínico-patológicas se describen en la *Tabla 20*.

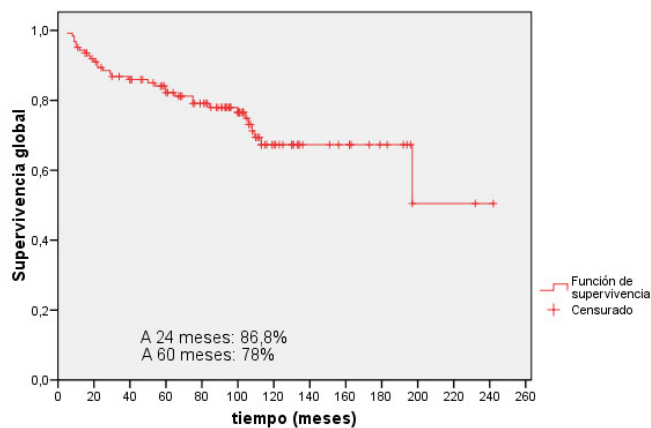


VARIABLE /categorías	CUELLO (%)		VALOR de p
	No disección (Grupo II)	Si disección (Grupo I)	
<b>Sexo</b> Hombre Mujer	26 (60,5) 17 (39,5)	64 (79) 17 (21)	<b>0,02</b>
<b>Edad</b> <=40 >40	6 (14) 37 (86)	5 (6,2) 76 (93,8)	0,1
<b>Hábitos Tóxicos</b> No Si	19 (44,2) 24 (55,8)	24 (29,6) 57 (70,4)	0,1
<b>Lesiones premalignas</b> No Si	25 (58,1) 18 (41,9)	62 (76,5) 19(23,5)	<b>0,03</b>
<b>Segundas neoplasias</b> No Si	31 (72,1) 12 (27,9)	67 (82,7) 14 (17,3)	0,1
<b>Localización</b> Lengua Suelo de boca	33 (82,5) 7 (17,5)	44 (63,8) 25 (36,2)	<b>0,03</b>
<b>Estadio tumoral</b> I (pT1N0M0) II (pT2N0M0)	31 (72,1) 12 (27,9)	31 (38,3) 50 (61,7)	<b>&lt;0,01</b>
<b>Diferenciación histológica</b> Ca bien diferenciado Ca moderadamente diferenciado Ca pobremente diferenciado	17 (40,5) 20 (47,6) 5 (11,9)	30 (37,1) 44 (54,3) 7 (8,6)	0,7
<b>Márgenes quirúrgicos</b> Correctos Afectos	35 (81,4) 8 (18,6)	72 (90) 8 (10)	0,1
<b>Espesor tumoral</b> <=2 mm >2 mm	10 (26,3) 28 (73,7)	10 (12,8) 68 (87,2)	0,07
<b>Infiltración perineural</b> No Si	29 (87,9) 4 (12,1)	48 (78,7) 13 (21,3)	0,2
<b>Inflamación peritumoral</b> No Si	2 (6,2) 30 (93,8)	13 (30,2) 30 (69,8)	<b>&lt;0,01</b>

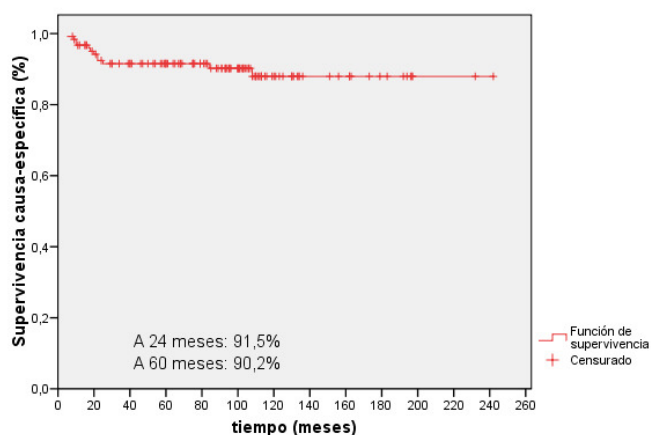
Tabla 20. Diferencias de distribución entre los Grupos I y II y las variables clínico-patológicas.

### 5.2.1.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL, SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA Y SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN LA SERIE GLOBAL

Se analiza mediante el test de Kaplan y Meier la supervivencia global y causa-específica de la serie global. La supervivencia global de la serie es del 89,4% a 2 años y del 84,1% a 5 años (*Gráfico 1*). Se observa una supervivencia causa-específica a 2 años de 91,5% y a 5 años de 90,2% (*Gráfico 2*).

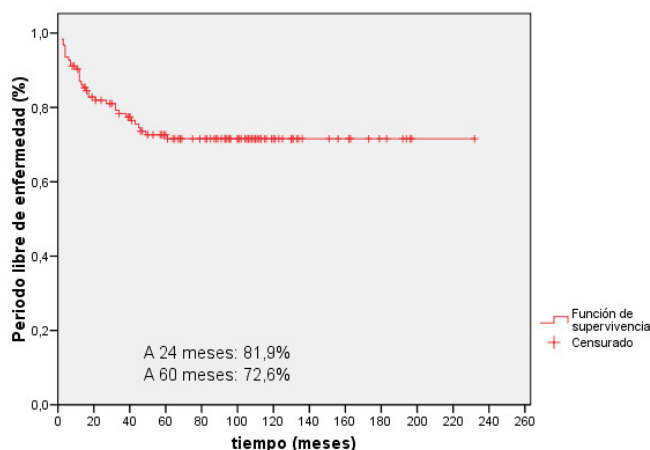


*Gráfico 1.* Curva de supervivencia global de la serie global.



*Gráfico 2.* Curva de supervivencia causa-específica de la serie global.

De igual manera, se observa una supervivencia libre de enfermedad a 2 años de 81,9% y una supervivencia libre de enfermedad a 5 años de 72,6% (*Gráfico 3*).



*Gráfico 3.* Curva de supervivencia libre de enfermedad en la serie global.

### 5.1.2.3. SUPERVIVENCIA EN LOS GRUPOS I Y II

Se analiza mediante el test de Log-Rank la relación de supervivencia entre los Grupos I y II. En relación con la supervivencia libre de enfermedad, en el Grupo I se observa una tasa de recidivas a 5 años de 19,5% (supervivencia libre de enfermedad de 80,5%) frente a una tasa de recidivas a 5 años de 42,6% (supervivencia libre de enfermedad de 57,4%) en el Grupo II. Estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) (*Gráfico 4*). En cuanto a la supervivencia causa-específica, no se han encontrado diferencias significativas entre los Grupos I y II ( $p = 0,5$ ) de modo que la supervivencia causa-específica para el Grupo I a 5 años es de 92,4% años frente a 90% años en el Grupo II. (*Gráfico 5*).

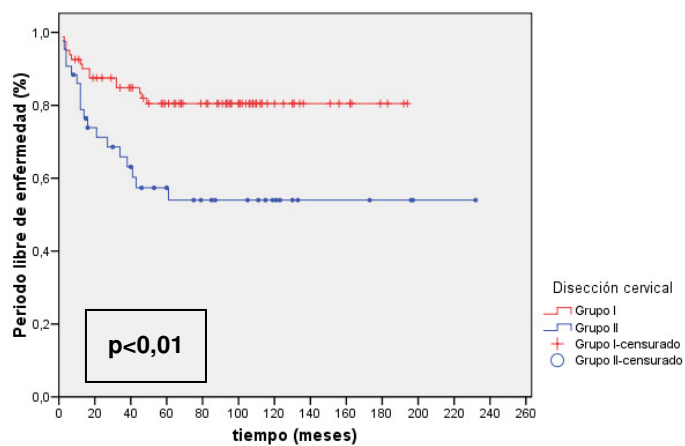


Gráfico 4. Supervivencia libre de enfermedad para los Grupos I y II.

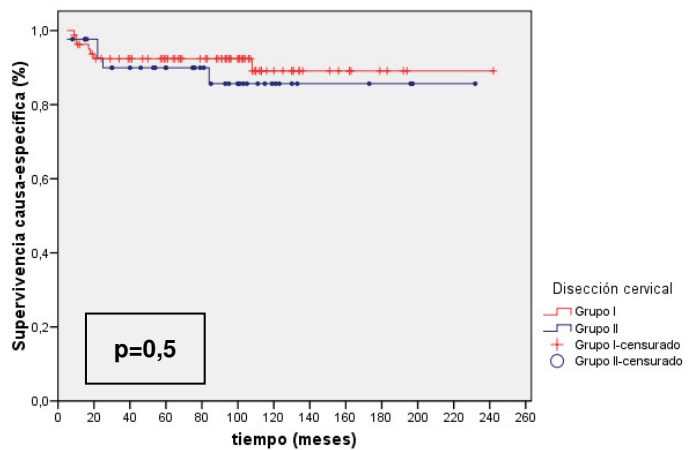


Gráfico 5. Supervivencia causa-específica para los Grupos I y II.

### 5.2.2. ANÁLISIS DEL ÍNDICE DE ANNEROTH

Se estudia la asociación entre la Clasificación de Anneroth y la presencia de recidivas loco-regionales en la serie global de pacientes. No se ha encontrado ninguna relación significativa con el índice de Anneroth y con las diferentes variables de la clasificación (*Tabla 21*).

VARIABLE /categorías	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
<b>Índice de Anneroth</b> Valor I (<=13) Valor II (>13)	46 (79,3) 41 (71,9)	12 (20,7) 16 (28,1)	0,3
<b>Grado de queratinización</b> Valor I Valor II	32 (76,2) 55 (75,3)	10 (23,8) 18 (24,7)	0,9
<b>Polimorfismo nuclear</b> Valor I Valor II	71 (77,2) 16 (69,6)	21 (22,8) 7 (30,4)	0,4
<b>Índice de mitosis</b> Valor I Valor II	78 (75) 9 (81,8)	26 (25) 2 (18,2)	0,4
<b>Patrón de invasión</b> Valor I Valor II	40 (83,3) 47 (70,1)	8 (16,7) 20 (29,9)	0,1
<b>Grado de invasión</b> Valor I Valor II	40 (72,7) 47 (78,3)	15 (27,3) 13 (21,7)	0,4
<b>Infiltración linfoplasmocitaria</b> Valor I Valor II	56 (72,7) 31 (81,6)	21 (27,3) 7 (18,4)	0,2

*Tabla 21.* Asociación entre las recidivas y el índice de Anneroth.

No se ha observado asociación entre este índice y la supervivencia causa-específica, así como con las variables de la clasificación (*Tabla 22*).

VARIABLE /categorías	SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	
<b>Índice de Anneroth</b> Valor I ( $\leq 13$ ) Valor II ( $> 13$ )	52 (89,7) 54 (94,7)	6 (10,3) 3 (5,3)	0,2
<b>Grado de queratinización</b> Valor I Valor II	37 (88,1) 69 (94,5)	5 (11,9) 4 (5,5)	0,1
<b>Polimorfismo nuclear</b> Valor I Valor II	84 (91,3) 22 (95,7)	8 (8,7) 1 (4,3)	0,4
<b>Índice de mitosis</b> Valor I Valor II	96 (92,3) 10 (90,9)	8 (7,7) 1 (9,1)	0,6
<b>Patrón de invasión</b> Valor I Valor II	46 (95,8) 60 (89,6)	2 (4,2) 7 (10,4)	0,1
<b>Grado de invasión</b> Valor I Valor II	51 (92,7) 55 (91,7)	4 (7,3) 5 (8,3)	0,5
<b>Infiltración linfoplasmocitaria</b> Valor I Valor II	70 (90,9) 36 (94,7)	7 (9,1) 2 (5,3)	0,3

*Tabla 22.* Asociación entre la supervivencia causa-específica y el índice de Anneroth.

### 5.2.3. ANÁLISIS DE LA LINFANGIOGÉNESIS INTRATUMORAL

Se analiza la asociación entre la presencia de linfangiogénesis intratumoral en las muestras histológicas y el desarrollo de recidivas loco-regionales. En la serie global de pacientes, no se observa una asociación entre, la linfangiogénesis y las recidivas, de modo que en el grupo LF+ se observa un 27,4% de recidivas frente a 24,5% en el grupo LF- ( $p=0,7$ ).

Se analiza la relación de estas dos variables por grupos para ver si existen diferencias significativas. Se objetiva una asociación entre la linfangiogénesis y las recidivas en el Grupo I de pacientes (24,5% de recidivas en el grupo LF+ frente a 6,7% en el grupo LF-;  $p=0,03$ ). Sin embargo, en el Grupo II no se identifica asociación entre estas dos variables (33,3% de recidivas en el grupo LF+ frente a 52,6% en el grupo LF-;  $p=0,2$ ). La distribución por frecuencias se muestra en la *Tabla 23*.

SERIE GLOBAL			
VARIABLE /categorías	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
Linfangiogénesis intratumoral LF- LF+	37 (75,5) 53 (72,6)	11 (24,5) 20 (27,4)	0,7
GRUPO I			
VARIABLE /categorías	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
Linfangiogénesis intratumoral LF- LF+	28 (93,3) 37 (75,5)	2 (6,7) 12 (24,5)	<b>0,03</b>
GRUPO II			
VARIABLE /categorías	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
Linfangiogénesis intratumoral LF- LF+	9 (47,4) 16 (66,7)	10 (52,6) 8 (33,3)	0,2

*Tabla 23.* Análisis de correlación entre linfangiogénesis y recidivas loco-regionales.

En cuanto a la supervivencia causa-específica, no se ha encontrado una relación significativa con la linfangiogénesis intratumoral tanto en la serie global como en los Grupos I y II (*Tabla 24*).

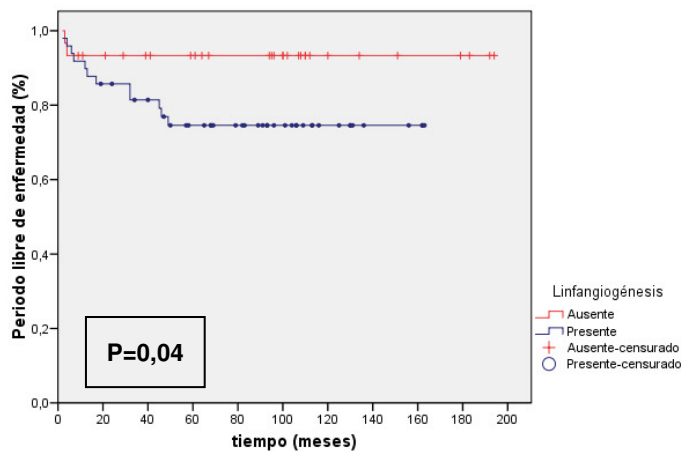
SERIE GLOBAL			
VARIABLE /categorías	SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	0,9
Linfangiogénesis intratumoral			
LF-	44 (89,8)	5 (10,2)	
LF+	66 (90,4)	7 (9,6)	
GRUPO I			
VARIABLE /categorías	SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	0,4
Linfangiogénesis intratumoral			
LF-	28 (93,3)	2 (6,7)	
LF+	44 (89,8)	5 (10,2)	
GRUPO II			
VARIABLE /categorías	SUPERVIVENCIA CAUSA-ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	0,3
Linfangiogénesis intratumoral			
LF-	16 (84,2)	3 (15,8)	
LF+	22 (91,7)	2 (8,3)	

*Tabla 24.* Análisis de correlación entre linfangiogénesis y supervivencia causa-específica.

Según estos resultados, la linfangiogénesis intratumoral se asocia con las recidivas loco-regionales en el Grupo I de pacientes. Al analizar la supervivencia libre de enfermedad mediante el test Log-Rank se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,04$ ): tasa de recidivas a 5 años de 25,4% (supervivencia libre de enfermedad de 74,6%) en el grupo LF+ frente a



una tasa de recidivas a 5 años de 6,7% (supervivencia libre de enfermedad de 93,3%) en el grupo LF- (*Gráfico 6*).



*Gráfico 6.* Supervivencia libre de enfermedad para los grupos LF+ y LF-.

Respecto a la relación entre la linfangiogénesis y otras variables del estudio, se encuentra una asociación entre la presencia de linfangiogénesis y el sexo femenino tanto para la serie global como para los Grupos I y II de modo que las mujeres presentan una mayor frecuencia de vasos linfáticos positivos (*Tabla 25*). En la serie global y el Grupo I, se observa una mayor frecuencia de linfangiogénesis positiva en el grupo de pacientes no fumadores frente a los fumadores ( $p<0,01$ ). En relación con la localización tumoral, se identifica una asociación entre LF+ y los tumores de lengua móvil en la serie global y en el Grupo II ( $p<0,05$ ). En este Grupo II, todos los pacientes con vasos linfáticos positivos mostraron una ausencia de infiltración perineural ( $p=0,04$ ) (*Tabla 25*). El resto de variables no mostraron una asociación significativa. La ausencia de relación estadísticamente significativa también se apreció en el estudio entre la linfangiogénesis y los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ .

VARIABLE/ categorías	LINFANGIOGENESIS								
	SERIE GLOBAL			GRUPO I			GRUPO II		
	LF-	LF+	p	LF-	LF+	p	LF-	LF+	p
<b>Sexo</b>									
Hombre	43(48,9)	45(51,1)	<b>&lt;0,01</b>	28(45,2)	34(54,8)	<b>&lt;0,01</b>	15(57,7)	11(42,3)	<b>0,02</b>
Mujer	6(17,6)	28(82,4)		2(11,8)	15(88,2)		4(23,5)	13(76,5)	
<b>Edad</b>									
<=40	6(12,2)	43(87,8)	0,3	1(20)	4(80)	0,3	5(83,3)	1(16,7)	0,05
>40	5(6,8)	68(93,2)		29(39,2)	45(60,8)		14(37,8)	23(62,2)	
<b>Hábitos Tóxicos</b>									
No	11(25,6)	32(74,4)	<b>&lt;0,01</b>	3(12,5)	21(87,5)	<b>&lt;0,01</b>	8(42,1)	11(57,9)	0,8
Si	38(48,1)	79(51,9)		27(49,1)	28(50,9)		11(45,8)	13(54,2)	
<b>Les premalignas</b>									
No	35(41,2)	50(58,8)	0,7	25(41,7)	35(58,3)	0,2	10(40)	15(60)	0,5
Si	14(37,8)	23(62,2)		5(26,3)	14(73,7)		9(50)	9(50)	
<b>Seg neoplasias</b>									
No	39(79,6)	10(20,4)	0,9	26(39,4)	40(60,6)	0,5	13(41,9)	18(58,1)	0,6
Si	58(79,5)	15(20,5)		4(30,8)	9(69,2)		6(50)	6(50)	
<b>Localización</b>									
Lengua	25(32,5)	52(67,5)	<b>0,04</b>	14(31,8)	30(68,2)	0,3	11(33,3)	22(66,7)	<b>0,01</b>
Suelo de boca	17(53,1)	15(46,9)		11(44)	14(56)		6(85,7)	1(14,3)	
<b>Estadio tumoral</b>									
I (pT1N0M0)	25(40,3)	37(59,7)	0,9	10(32,3)	21(67,7)	0,4	15(48,4)	16(51,6)	0,3
II (pT2N0M0)	24(40)	36(60)		20(41,7)	28(58,3)		4(33,3)	8(66,7)	
<b>Dif histológica</b>									
Ca bien dif	15(31,9)	32(68,1)	0,3	9(30)	21(70)	0,4	6(35,3)	11(64,7)	0,6
Ca moderad dif	29(46)	34(54)		18(41,9)	25(58,1)		11(55)	9(45)	
Ca pobrem dif	5(45,5)	6(54,5)		3(50)	3(50)		2(40)	3(60)	
<b>Márgenes</b>									
Correctos	40(38,1)	26(61,9)	0,3	25(35,7)	45(64,3)	0,4	15(42,9)	20(57,1)	0,7
Afectos	8(50)	8(50)		4(50)	4(50)		4(50)	4(50)	
<b>Espesor tumoral</b>									
<=2 mm	12(60)	8(40)	0,05	5(50)	5(50)	0,3	7(70)	3(30)	0,09
>2 mm	35(36,8)	60(63,2)		24(35,8)	43(64,2)		11(39,3)	17(60,7)	
<b>Inf perineural</b>									
No	29(38,2)	47(61,8)	0,2	17(36,2)	30(63,8)	0,8	12(41,4)	17(58,6)	<b>0,04</b>
Si	9(52,9)	8(47,1)		5(38,5)	8(61,5)		4(100)	0(0)	
<b>Infl peritumoral</b>									
No	7(46,7)	8(53,3)	0,7	5(38,5)	8(61,5)	0,9	14(46,7)	16(53,3)	0,2
Si	25(42,4)	34(57,6)		11(37,9)	18(62,1)		2(100)	0(0)	
<b>C1772T</b>									
C/C	21(38,9)	33(61,1)	0,5	9(31)	20(69)	0,6	12(48)	13(52)	0,3
Portador T	4(30,8)	9(69,2)		2(33,3)	4(66,7)		2(28,6)	5(71,4)	
<b>G1790A</b>									
G/G	15(40,5)	22(59,5)	0,5	8(42,1)	11(57,9)	0,1	7(38,9)	11(61,1)	0,5
Portador A	8(33,3)	16(66,7)		3(21,4)	11(78,6)		5(50)	5(50)	

Tabla 25. Asociación entre linfangiogénesis y variables clínico-patológicas y polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ .

En el estudio del índice de Anneroth y sus diferentes variables frente a la linfangiogénesis, se identifica una asociación significativa entre la infiltración linfoplasmocitaria moderada o marcada (Valor I) y la presencia de vasos linfáticos para la serie global y el Grupo I. En la serie global se observa una asociación entre el grado de queratinización alto o moderado (Valor I) y la presencia de vasos linfáticos intratumorales ( $p=0,03$ ) pero esta asociación no se encuentra en el análisis por grupos. Estos datos se muestran en la *Tabla 26*.

VARIABLE/ categorías	LINFANGIOGENESIS								
	SERIE GLOBAL			GRUPO I			GRUPO II		
	LF-	LF+	p	LF-	LF+	p	LF-	LF+	p
<b>Índ Anneroth</b> Valor I ( $\leq 13$ ) Valor II ( $> 13$ )	18(31) 27(47,4)	40(69) 30(52,6)	0,07	8(24,2) 18(46,2)	25(75,8) 21(53,8)	0,054	10(40) 9(50)	15(60) 9(50)	0,5
<b>Gr queratinización</b> Valor I Valor II	11(26,2) 34(46,6)	31(73,8) 39(53,4)	<b>0,03</b>	7(26,9) 19(41,3)	19(73,1) 27(58,7)	0,2	4(25) 15(55,6)	12(75) 12(44,4)	0,05
<b>Polimorfismo nucl</b> Valor I Valor II	35(38) 10(43,5)	57(62) 13(56,5)	0,6	18(32,7) 8(47,1)	37(67,3) 9(52,9)	0,2	17(45,9) 2(33,3)	20(54,4) 4(66,7)	0,4
<b>Índ mitosis</b> Valor I Valor II	40(38,5) 5(45,5)	64(61,5) 6(54,5)	0,6	23(35,9) 3(37,5)	41(64,1) 5(62,5)	0,9	17(42,5) 2(66,7)	23(57,5) 1(33,3)	0,4
<b>Patrón de invasión</b> Valor I Valor II	17(35,4) 28(41,8)	31(64,6) 39(58,2)	0,4	11(36,7) 15(35,7)	19(63,3) 27(64,3)	0,9	6(33,3) 13(52)	12(66,7) 12(48)	0,2
<b>Grado de invasión</b> Valor I Valor II	23(41,8) 22(36,7)	32(58,2) 38(63,3)	0,5	11(37,9) 15(34,9)	18(62,1) 28(65,1)	0,7	12(46,2) 7(41,2)	14(53,8) 10(58,8)	0,7
<b>Inf linfoplasmocit</b> Valor I Valor II	23(29,9) 22(57,9)	54(70,1) 16(42,1)	<b>&lt;0,01</b>	10(21,7) 16(61,5)	36(78,3) 10(38,5)	<b>0,01</b>	13(41,9) 6(50)	18(58,1) 6(50)	0,6

*Tabla 26.* Asociación entre linfangiogénesis y el índice de Anneroth.

#### 5.2.4. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$

##### 5.2.4.1. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ ENTRE VOLUNTARIOS SANOS Y PACIENTES.

Se analiza la distribución de los dos polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  estudiados en los voluntarios sanos y la serie global de pacientes. Se observa una asociación significativa en la distribución genotípica del polimorfismo G1790A, de modo que los voluntarios sanos muestran una frecuencia del alelo A de 6,5% frente a una frecuencia de este alelo A de 38,1% en los pacientes ( $p<0,01$ ) (*Tabla 27*). La Odds ratio o razón de riesgo de presentar un tumor intraoral para el polimorfismo G1790A, calculada a partir de la distribución de frecuencias, es de 9,5 (4,08-22,08) para los portadores del alelo A.

CONTROLES /PACIENTES	G1790A		
	GENOTIPO (%)		VALOR de p
	G/G	Alelo A	
Voluntarios sanos Pacientes	130 (93,5) 38 (60,3)	9 (6,5) 25 (39,7)	<0,01 (*)

(\*)OR: 9,5 (4,08-22,08)

*Tabla 27.* Distribución genotípica del polimorfismo G1790A.

En relación con el polimorfismo C1772T, la frecuencia del alelo T es de 23,6% en los voluntarios sanos frente a un 18,8% en los paciente aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,4$ ) (*Tabla 28*).

CONTROLES /PACIENTES	C1772T		
	GENOTIPO (%)		VALOR de p
	C/C	Alelo T	0,4
Voluntarios sanos Pacientes	113 (76,4) 56 (81,2)	35 (23,6) 13 (18,8)	

*Tabla 28.* Distribución genotípica del polimorfismo C1772T.

#### 5.2.4.2. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ Y SUPERVIVENCIA

Se analiza la relación entre el polimorfismo C1772T y las recidivas loco-regionales en el grupo de pacientes. Los pacientes con el genotipo C/C presentan una tasa de recidivas de 26,8% frente a un 46,2% en los pacientes con presencia del alelo T. Sin embargo esta diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,1$ ) (*Tabla 29*). En cuanto al polimorfismo G1790A, los pacientes con genotipo G/G presentan una frecuencia de recidivas de 21,1% frente a un 48% en los pacientes que muestran un alelo A, siendo estas diferencia estadísticamente significativas ( $p=0,02$ ) (*Tabla 29*). En cuanto a la supervivencia causa-específica, no se han encontrado diferencias significativas en las tasa de mortalidad para ambos polimorfismos (*Tabla 30*).

C1772T GENOTIPO	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
C/C Alelo T	41 (73,2) 7 (53,8)	15 (26,8) 6 (46,2)	0,1
G1790A GENOTIPO	RECIDIVAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
G/G Alelo A	30 (78,9) 13 (52)	8 (21,1) 12 (48)	<b>0,02</b>

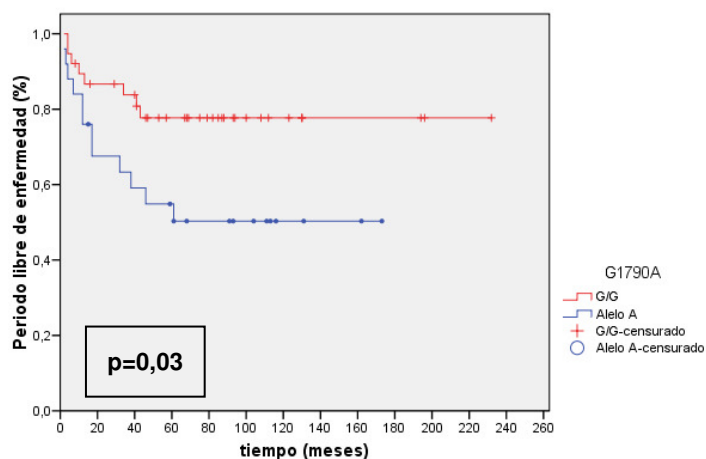
*Tabla 29.* Asociación entre los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  y las recidivas.

C1772T GENOTIPO	SUPERVIVENCIA CAUSA- ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	
C/C Alelo T	50 (89,3) 11 (84,6)	6 (10,7) 2 (15,4)	0,4
G1790A GENOTIPO	SUPERVIVENCIA CAUSA- ESPECÍFICA (%)		VALOR de p
	Vivo/muerto por otra causa	Muerto por tumor	
G/G Alelo A	33 (86,8) 22 (88)	5 (13,2) 3 (12)	0,6

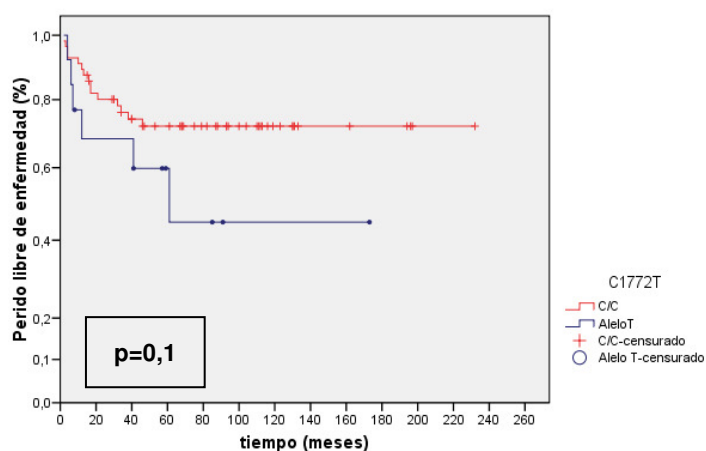
*Tabla 30.* Asociación entre los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  y la supervivencia causa-específica.

Al igual que con la linfangiogénesis intratumoral, se objetiva una asociación entre las recidivas loco-regionales y el polimorfismo G1790A de

HIF-1 $\alpha$ . En el test Log-Rank de supervivencia libre de enfermedad para el polimorfismo G1790A, los pacientes con el alelo A presentan una tasa de recidivas a 5 años de 45,1% (supervivencia libre de enfermedad de 54,9%) frente a una tasa de recidivas a 5 años de 22,3% (supervivencia libre de enfermedad de 77,7%) en los pacientes sin el alelo polimórfico ( $p=0,03$ ) (*Gráfico 7*). Para el polimorfismo C1772T, la tasa de recidivas a 5 años es de 59,8% para los portadores del alelo polimórfico T frente a una tasa de 72,1% para los pacientes sin alelo polimórfico ( $p=0,1$ ) aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (*Gráfico 8*).



*Gráfico 7.* Supervivencia libre de enfermedad para el polimorfismo G1790A.



*Gráfico 8.* Supervivencia libre de enfermedad para el polimorfismo C1772T.

#### 5.2.4.3. ANÁLISIS DE HIF-1 $\alpha$ CON OTRAS VARIABLES

Para estudiar la influencia de los genotipos mutados de HIF-1 $\alpha$  en los pacientes con CEI, se analiza la posible relación de éstos con otras variables empleadas en el análisis previo. En relación con C1772T y las variables clínico-patológicas, destaca la relación entre la presencia del alelo mutado T y el sexo de modo que dentro del grupo de mujeres la frecuencia del alelo T es mayor (31,8%) que dentro del grupo de varones (12,8%), con un valor de p próximo a la significación (p=0,06) (*Tabla 31*). No se ha encontrado una relación entre C1772T y la presencia de segundos tumores primarios en este grupo de pacientes, así como con otras variables clínico-patológicas.

SEXO	C1772T		
	GENOTIPO (%)		VALOR de p
	C/C	Alelo T	0,06
Varones	41 (87,2)	7 (12,8)	
Mujeres	15 (68,2)	7 (31,8)	

*Tabla 31.* Asociación entre C1772T y el sexo.

En relación con el índice de Anneroth, se encuentra una asociación significativa entre la presencia del alelo T y el polimorfismo nuclear de modo que todos los pacientes con alelo mutado T presentan un polimorfismo nuclear escaso o moderado (valor I) (p=0,03) (*Tabla 32*). Sin embargo, en la relación encontrada con el índice de mitosis, los casos con alelo T muestran una frecuencia mayor de mitosis >3 por campo (valor II) (p=0,02) (*Tabla 32*). El índice de Anneroth no muestra asociación con C1772T (datos no mostrados).



POLIMORFISMO NUCLEAR	C1772T		
	GENOTIPO (%)		VALOR de p
	C/C	Alelo T	
Valor I Valor II	39 (75) 14 (100)	13 (25) 0 (0)	0,03
ÍNDICE DE MITOSIS	C1772T		
	GENOTIPO (%)		VALOR de p
	C/C	Alelo T	
Valor I Valor II	50 (84,7) 3 (42,9)	9 (15,3) 4 (57,4)	0,02

*Tabla 32.* Asociación entre C1772T y las variables polimorfismo nuclear e índice de mitosis de la clasificación de Anneroth.

En cuanto G1790A, no se ha encontrado una relación significativa entre este polimorfismo y la presencia de segundos tumores primarios así como con el índice de Anneroth y el resto de variables clínico-patológicas (datos no mostrados).

Como se muestra con anterioridad en la *Tabla 25*, al estudiar la relación entre estos dos polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  y la linfangiogénesis intratumoral, no se ha demostrado una asociación significativa entre ambas variables.

### 5.3. ANÁLISIS EN EL GRUPO DE SEGUNDAS NEOPLASIAS

#### 5.3.1. ANALISIS DESCRIPTIVO

El grupo de pacientes con segundos tumores primarios está constituido por 26 casos, 21 varones (80,8%) y 5 mujeres (19,2%), con una edad media de 60,5 +/-10,3 meses. De estos 26 pacientes, 14 pacientes (53,8%) pertenecen al Grupo I y 12 pacientes (46,2%) al Grupo II. Presentan un único segundo tumor primario 24 casos y dos segundos primarios 2 casos, con un total de 28 segundos tumores. En 10 casos (35,7%) la segunda neoplasia se presentó previa al tumor intraoral a estudio, en 2 casos (7,1%) se trata de un tumor sincrónico con el tumor a estudio y en 16 casos (57,2%) la presentación es posterior a éste. La histología de los segundos tumores así como su localización se muestra en la *Tabla 33*. Destaca el carcinoma epidermoide (22 casos; 78,5%) frente a otros tipos histológicos ya que la localización más frecuente de estas segundas neoplasias es la intraoral (10 casos; 35,7%). En este grupo de pacientes destaca la presencia de hábitos tóxicos en un 73,1% de los pacientes, mientras que sólo un 23% de los pacientes tienen antecedentes de lesiones premalignas (*Tabla 33*). De los casos en los que se han estudiado los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ , se detecta un genotipo mutado para C1772T en 2 pacientes del grupo de segundas neoplasias (14,2%; n=14), mientras que para el polimorfismo G1790A se detecta el alelo A en 6 casos de este grupo (50%; n=12) (*Tabla 33*).

En este grupo de pacientes, permanecen vivos al final del periodo de seguimiento 12 pacientes (46,2%), fallecen por el tumor intraoral primario 3

pacientes (11,5%) y fallecen por otra causa distinta del carcinoma primario 11 pacientes (42,3%). De estos pacientes que fallecen por causas distintas del tumor primario, 7 pacientes (63,6%) fallecen por esta segunda neoplasia. Así mismo, desarrollan recidivas loco-regionales del tumor primario 12 casos (46,2%) de este grupo de segundas neoplasias.

Respecto a las características del tumor primario en este grupo de segundas neoplasias, destacan los tumores primarios de lengua móvil (16 casos; 61,5%) seguidos de los localizados en el suelo de boca (5 casos; 19,2%) y por los localizados en mucosa yugal, encía, orofaringe, base de lengua y paladar blando (1 caso; 3,8% respectivamente). El 50% de los tumores primarios son estadios I (13 casos) y el otro 50% de los casos estadios II. Predominan los carcinomas epidermoides moderadamente diferenciados (15 casos; 57,7%) al igual que en la serie global frente a los bien diferenciados (9 casos; 34,6%) y los pobremente diferenciados (2 casos; 7,7%). Los márgenes de tumor primario están correctos en 18 casos (72%) y afectados en 7 casos (28%). Se objetiva infiltración perineural en el tumor primario en 3 casos (16,7%), así como inflamación peritumoral en 13 casos (76,5%). El espesor del tumor primario es >2 mm en un 91,7% de los casos (22 casos).

Respecto a la presencia de linfangiogénesis intratumoral en el tumor primario, ésta se localiza en un 60% de los casos de este grupo (15 casos). El índice de Anneroth del tumor primario es  $\leq 13$  en 11 casos (44%) y  $>13$  en 14 casos (56%).

<b>HÁBITOS TÓXICOS</b>	<b>CASOS (%) n=26 (pacientes)</b>
No Tabaco Tabaco+alcohol	7 (26,9) 9 (34,6) 10 (38,5)
<b>LESIONES PREMALIGNAS</b>	<b>CASOS (%) n=26</b>
No Leucoplasia Liquen plano Eritroplasia	20 (77) 3 (11,5) 2 (7,7) 1 (3,8)
<b>HISTOLOGÍA SEGUNDAS NEOPLASIAS</b>	<b>CASOS (%) n=28 (tumores)</b>
Carcinoma epidermoide bien diferenciado Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado Carcinoma epidermoide (sin especificar diferenciación) Adenocarcinoma Carcinoma urotelial Linfoma	6 (21,4) 7 (25) 5 (17,8) 4 (14,3) 4 (14,3) 1 (3,6) 1 (3,6)
<b>LOCALIZACIÓN SEGUNDAS NEOPLASIAS</b>	<b>CASOS (%) n=28</b>
Intraoral Esófago Laringe Pulmón Labio Mama Renal Vesical Colorrectal Próstata Hematológico Pene Metástasis ósea de origen desconocido	10 (35,7) 4 (14,2) 3 (10,6) 2 (7,1) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6) 1 (3,6)
<b>C1772T</b>	<b>CASOS (%) n=15</b>
C/C C/T T/T	12 (85,8) 1 (7,1) 1 (7,1)
<b>G1790A</b>	<b>CASOS (%) n=12</b>
G/G G/A A/A	6 (50) 5 (41,7) 1 (8,3)

*Tabla 33. Análisis descriptivo en el grupo de segundas neoplasias.*

### 5.3.2. ANÁLISIS COMPARATIVO

Se analiza las posibles diferencias entre los pacientes con y sin segundos tumores primarios en relación a las diferentes variables clínico-patológicas a estudio. En relación al sexo, la edad, los hábitos tóxicos y las lesiones premalignas, no se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos ( $p>0,05$ ). En cuanto a las características del tumor primario, los pacientes con márgenes afectos del tumor primario presentan mayor frecuencia de segundas neoplasias que los pacientes con márgenes correctos del tumor primario (7 casos; 43,8% frente a 18 casos; 16,8%) con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,01$ ). Sin embargo, de estos 7 pacientes con afectación de los márgenes, en 6 casos se trataba de segundas neoplasias en localizaciones distintas de la intraoral y en un paciente una segunda neoplasia intraoral 10 años antes del tumor primario a estudio. El resto de características del tumor primario así como el índice de Anneroth y la linfangiogénesis intratumoral no presentan diferencias significativas (datos no mostrados).

Al analizar la posible asociación entre los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  y las segundas neoplasias no se encuentran diferencias estadísticamente significativas con C1772T y G1790A y la frecuencia de segundos tumores (*Tabla 34*).

C1772T GENOTIPO	SEGUNDAS NEOPLASIAS (%)		VALOR de p
	No	Si	
C/C Alelo T	44 (78,6) 11 (84,6)	12 (21,4) 2 (15,4)	0,4
G/G Alelo A	32 (84,2) 19 (96)	6 (15,8) 6 (24)	

Tabla 34. Asociación entre los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  y las segundas neoplasias.

En el estudio de supervivencia de este grupo de paciente teniendo en cuenta la mortalidad por causa tumoral (tumor primario y segundas neoplasias), se observa que la supervivencia a 5 años para el grupo de segundas neoplasias es de 78,9% frente a un 92,4% para los pacientes sin segundas neoplasias ( $p<0,01$ ) (Gráfico 9).

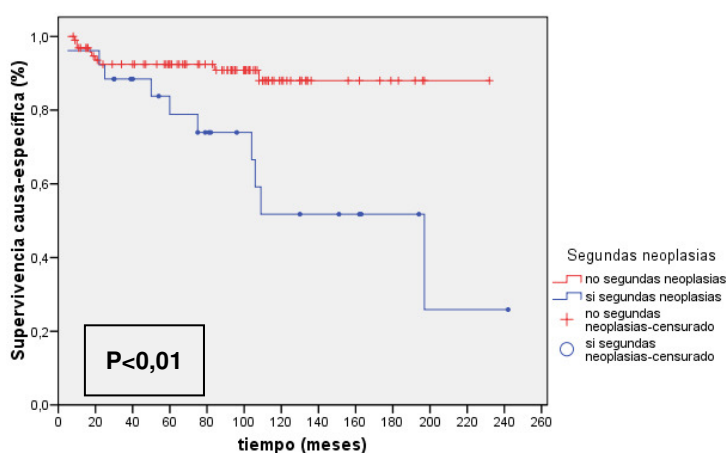


Gráfico 9. Supervivencia causa-específica y segundas neoplasias.

## **DISCUSIÓN**





## 6.1. ESTADIOS PRECOCES Y METÁSTASIS GANGLIONARES

Un porcentaje no desdeñable de pacientes con CEI en estadios precoces presentan una evolución tórpida a pesar de tratarse de tumores teóricamente localizados y, por tanto, curables con los tratamientos primarios. Es por ello que el objeto de este trabajo ha sido investigar los posibles factores que pueden influenciar negativamente en estos tumores, ya que su identificación precoz puede determinar cambios en las estrategias terapéuticas hasta ahora consideradas como estándar para estos carcinomas precoces.

El pronóstico del CEI está determinado fundamentalmente por el desarrollo de enfermedad metastásica en los ganglios linfáticos regionales. Mientras que el tratamiento recomendado en los pacientes con estadios precoces que presentan metástasis ganglionares al diagnóstico es claro, éste resulta controvertido en los casos N0. La incidencia de metástasis ocultas en estos estadios I y II varia entre un 6% a un 46% según las diferentes series.<sup>17,39,42-44,46,200</sup> Las micrometástasis linfáticas se establecerían desde etapas tempranas del desarrollo tumoral y escaparían a las técnicas diagnósticas convencionales.<sup>43,106,201,202</sup> *Kaya y cols* encuentran una incidencia de metástasis ocultas del 21,7% en carcinomas de lengua T1-T2 y recomiendan una cirugía electiva del cuello en estos tumores.<sup>44</sup> *Ho y cols* muestran un tasa de metástasis ocultas del 42,1% en una serie de estadios precoces en los cuales se realizó únicamente observación del cuello en el periodo de seguimiento.<sup>42</sup> Estos datos hacen pensar que el tratamiento del CEI no debe basarse únicamente en la estadificación tumoral (clasificación TNM) incluso en los estadios precoces, sino que deben considerarse estos otros

factores que puedan identificar los tumores de alto riesgo. La mejor manera de estadificación de un cuello N0 clínico parece ser la disección ganglionar cervical.<sup>200</sup>

Así mismo, el tipo de tratamiento cervical primario parece influir tanto en las recidivas como en la supervivencia de estos carcinomas precoces. En un estudio previo de nuestro grupo, la tasa de recidivas regionales en el grupo de pacientes tratados únicamente con resección local del tumor intraoral asciende a un 26,8% frente a un 8% en los pacientes tratados con disección cervical electiva, diferencias que son estadísticamente significativas.<sup>46</sup> *Dias y cols* observan diferencias en las recidivas cervicales en un grupo de carcinomas intraorales con estadio I, con tasas del 24% en aquellos tumores tratados con cirugía local frente a un 4% en los tratados con disección electiva, mientras que *Yuen y cols* también encuentran que la disección cervical electiva reduce la mortalidad por recidivas regionales y aumenta la tasa de supervivencia.<sup>39,81</sup> En el presente estudio estos datos se confirman de modo que el tipo de tratamiento primario del cuello influye de forma significativa en el desarrollo de recidivas loco-regionales con una tasa del 18,5% en el grupo de pacientes con disección cervical (Grupo I) frente a un 41,9% en el grupo de pacientes sin disección cervical (Grupo II) ( $p < 0,01$ ). Sin embargo, estas diferencias no parecen influir en la supervivencia causa-específica en esta serie ( $p > 0,05$ ).

Estas diferencias encontradas en las tasa de recidivas ha determinado que se estudien estos dos grupos de pacientes según el tipo de tratamiento cervical realizado. Al analizar los dos grupos de pacientes, Grupo I y II, se

objetivan ciertas diferencias en cuanto a las características clínico-patológicas. El Grupo II de pacientes presenta mayor frecuencia de mujeres y de lesiones premalignas que el Grupo I: 39,5% de mujeres frente a 21% ( $p=0,02$ ) y 41,9% de lesiones premalignas frente a 23,5% ( $p=0,03$ ). Así mismo, en el Grupo II son más frecuentes los tumores de lengua móvil y los tumores T1 que en el Grupo I y predominan los tumores con inflamación peritumoral: 82,5% de tumores de lengua frente a 63,8% ( $p=0,03$ ), 72,1% de T1 frente a 38,3% ( $p<0,01$ ) y 93,8% de tumores con inflamación peritumoral frente a 69,8% ( $p<0,01$ ). Esto indica que son grupos con diferente perfil clínico-patológico y esto puede influir en los estudios comparativos de la serie global respecto a la supervivencia y las recidivas ya que entonces no existiría una distribución homogénea en la serie. Estas diferencias pueden deberse a los criterios de selección a la hora de planificar el tratamiento quirúrgico en los tumores precoces: es posible que se tienda a ser más conservador al planificar un cuello electivo en las mujeres. De igual manera en los tumores pequeños de lengua móvil, sobretudo en los T1, se suelen indicar más resecciones locales amplias y vigilancia del cuello que en el suelo de boca, posiblemente por la mayor tendencia a la afectación bilateral en los tumores de suelo de boca que obliga en muchos casos a planificar una disección bilateral electiva, sobretudo en aquellos tumores que afectan o sobrepasan la línea media.<sup>200,203</sup> Otra posibilidad es que realmente muchos casos del grupo de pacientes sin cuello electivo se tratarían de falsos N0, donde ya existirían micrometástasis en tránsito en el momento del diagnóstico que se manifiestan clínicamente a lo largo de periodo de seguimiento, lo que refuerza las limitaciones de las estadificaciones actuales y la necesidad de plantear la disección electiva en estos casos.

Respecto a otros factores clínico-patológicos de la serie global y su relación con la supervivencia causa-específica y las recidivas loco-regionales, el grado de diferenciación según la clasificación de Broders parece asociarse con las tasas de supervivencia. En estudios previos se observaba esta asociación lineal de modo que aquellos carcinomas pobremente diferenciados presentaban un peor pronóstico frente a los moderadamente diferenciados y éstos frente a los bien diferenciados.<sup>4,43,52,66,204</sup> En este estudio los carcinomas moderadamente diferenciados muestran mejor pronóstico de supervivencia frente a los bien y a los pobremente diferenciados ( $p=0,03$ ). Estas diferencias con la literatura pueden deberse a la subjetividad asociada al investigador a la hora de analizar histológicamente las muestras y probablemente muchos de los casos catalogados como moderadamente diferenciados en realidad sean bien diferenciados. Esto apoya la idea de buscar otros sistemas de clasificación para poder medir la agresividad tumoral.

En este sentido, se analiza en el presente estudio la clasificación descrita por *Anneroth* en 1987 como índice más fiable de la agresividad biológica tumoral.<sup>70</sup> Sin embargo, en la serie a estudio no se ha encontrado ninguna asociación tanto con las recidivas como con la supervivencia para el índice de *Anneroth* y para cada una de las variables de la clasificación. Por ello tampoco puede considerarse en este caso un buen índice determinante para aquellos tumores más agresivos en los que se debe insistir en los tratamientos complementarios y llevar un seguimiento más estrecho.

En resumen, se selecciona para el presente estudio los CEI en estadios precoces ya que existe un porcentaje no desdeñable de metástasis ocultas en los ganglios linfáticos cervicales que puede empeorar las tasas de supervivencia. La disección cervical electiva parece ser el mejor método de estadificación en estos pacientes con tumores pequeños y parece disminuir de forma significativa las tasas de recurrencias.

## **6.2. LINFANGIOGENESIS INTRATUMORAL**

El estudio de la linfangiogénesis tumoral ha ido adquiriendo un papel relevante en el cáncer oral en los últimos años. Hasta fechas recientes se pensaba que la linfangiogénesis era un proceso que no tenía lugar en el cáncer y que los tumores carecían de vasos linfáticos.<sup>125-127,205</sup> Pero la aparición de biomarcadores específicos para los vasos linfáticos ha permitido revisar estas teorías y muchos han sido los autores que desde entonces han estudiado los procesos de linfangiogénesis así como su implicación pronóstica en los diferentes modelos tumorales.<sup>92,115-121,123,206</sup>

Clásicamente se ha sugerido que estos vasos linfáticos se encuentran localizados alrededor de tumor y que son éstos los conductores de las células tumorales para producir las metástasis (linfangiogénesis peritumoral). *Padera y cols* en su estudio sugieren la ausencia de vasos linfáticos funcionales en el interior del tumor y la implicación de los vasos linfáticos de la periferia tumoral en los mecanismos de diseminación tumoral.<sup>128</sup> Sin embargo, en el presente estudio se identifican vasos linfáticos iniciales en el interior del estroma tumoral

y con características que hacen pensar su formación *de novo*: íntima relación entre estos vasos y las células tumorales y presencia de proliferación endotelial en estos vasos linfáticos iniciales. Determinados marcadores, como la proteína nuclear asociada a proliferación *pKi67* que marca células con actividad proliferativa, pueden facilitar el estudio de estos neovasos en formación.<sup>92,206</sup> Determinar la importancia en el proceso de diseminación tumoral de los vasos linfáticos formados *de novo* frente a los vasos preexistentes peritumorales es un tema que todavía debe ser aclarado.<sup>91</sup> Otros autores también han observado la presencia de vasos linfáticos intratumorales en diferentes modelos tumorales y animales de experimentación (xenoinjertos).<sup>92,117,140,207</sup>

Una vez identificada la presencia de vasos linfáticos iniciales intratumorales, queda determinar su implicación en el pronóstico del CEI. Al analizar la asociación entre la linfangiogénesis intratumoral y el desarrollo de recidivas loco-regionales, no se encuentra una relación significativa en la serie global de pacientes, sin embargo, si se demuestra esta asociación en el grupo de paciente con disección cervical de modo que recidivan un 24,5% de los pacientes con presencia de linfangiogénesis frente a un 6,7% en los pacientes sin linfangiogénesis. Así mismo, en el grupo de pacientes sin disección cervical tampoco se encuentra una relación estadísticamente significativa entre estos dos factores, lo que justifica la ausencia de asociación en el grupo global. Estas diferencias entre el Grupo I y II pueden deberse a que realmente se tratan de grupos diferentes como se ha comentado anteriormente, lo que hace que la serie no sea homogénea y ambos grupos no comparables. Muchos pacientes del Grupo II probablemente sean pacientes en estadios avanzados con

metástasis ocultas al diagnóstico. Esta asociación confirma el estudio preliminar realizado por *Muñoz-Guerra y cols* en una serie de estadios precoces donde se establece una correlación entre linfangiogénesis y recidivas, mientras que no se objetiva una asociación con la supervivencia.<sup>123</sup> Este estudio es el primero en mostrar que la linfangiogénesis intratumoral es un factor pronóstico independiente. Otros autores demuestran un impacto de la linfangiogénesis intratumoral en el pronóstico de los carcinomas de cabeza y cuello, como *Beasley y cols* que encuentran una correlación entre la proliferación intratumoral linfática y las metástasis ganglionares en carcinomas de cabeza y cuello.<sup>92</sup> *Kyzas y cols* también muestran una influencia de la linfangiogénesis intratumoral en la supervivencia de carcinoma de cabeza y cuello.<sup>206</sup> De igual manera, *Miyahara y cols* demuestran una asociación entre la alta densidad de vasos linfáticos y las metástasis linfáticas ganglionares así como con la supervivencia en carcinomas orales.<sup>122</sup> En otro estudio realizado por nuestro grupo sobre carcinomas de laringe T1-T4 N0, se encuentra una asociación entre la presencia de vasos linfáticos intratumorales y el desarrollo de metástasis cervicales así como entre la expresión de VEGF-C y estas metástasis linfáticas.<sup>208</sup> En este estudio, los pacientes con linfangiogénesis intratumoral y aumento de expresión de VEGF-C muestran un menor periodo libre de enfermedad. Otros estudios intentan correlacionar la expresión del factor de crecimiento VEGF-C con la microvascularización linfática, así como con el desarrollo de metástasis ganglionares cervicales y con la supervivencia.<sup>61,115,117,118,122</sup> En una serie de carcinomas de cabeza y cuello, *Neuchrist y cols* demuestran una asociación entre el aumento de VEGF-C en el tejido tumoral y el desarrollo de recidivas loco-regionales.<sup>157</sup> Sin embargo, otros

autores muestran datos no concluyentes a este respecto, por lo que la relación entre VEGF-C y linfangiogénesis aún debe esclarecerse.<sup>92,152,187</sup>

Aunque en este estudio no se ha encontrado una asociación entre linfangiogénesis y la supervivencia causa-específica, al tratarse de una serie pequeña de estadios precoces con índice de supervivencia elevada, esto puede contribuir a la ausencia de correlación. Al aumentar el número de casos, o al estudiar estos procesos en estadios avanzados, es probable que se encuentren resultados más concluyentes. Queda por determinar si la microvascularización linfática ejerce el mismo papel en otros tipos tumorales y si influye en el pronóstico, ya que incluso en el carcinoma epidermoide las propiedades linfangiogénicas son variables dependiendo de la localización tumoral.<sup>106</sup>

Al analizar la asociación entre la linfangiogénesis y otras variables del estudio, se encuentra una relación significativa entre ésta y el sexo femenino tanto en la serie global como por grupos, de modo que un 82,4% de las mujeres de la serie global pertenecen al grupo LF+ frente a un 51,1% de los varones ( $p<0,01$ ). En estudios previos sobre cáncer de cabeza y cuello, otros autores no encuentran una asociación entre el sexo y la linfangiogénesis.<sup>92,122,206</sup> Por lo tanto, no existe una clara explicación para esta asociación, aunque podría plantearse una relación de las hormonas femeninas con la neoformación de vasos linfáticos. En un estudio experimental sobre cáncer de mama, se objetiva esta neoformación vascular linfática intratumoral



en los tumores estrógeno-dependientes, lo que sugiere un posible papel activo de los estrógenos en estos procesos.<sup>209</sup>

En este estudio se aprecia una relación de la linfangiogénesis con los hábitos tóxicos, de modo que los pacientes no fumadores y/o bebedores presentan más frecuencia de linfáticos en el estroma tumoral. Probablemente se trata de un hallazgo casual cuya significación debe ser aclarada en próximos estudios con un mayor grupo de pacientes con todos los estadios tumorales. Esto mismo ocurre con la localización tumoral, ya que se observa una mayor presencia de linfáticos intratumorales en los tumores de lengua móvil frente al suelo de boca la cual es una zona con rica vascularización linfática. Esto puede sugerir que el fenómeno de neoformación es más acusado en la lengua móvil por la menor red vascular peritumoral preexistente y que son estos fenómenos de linfangiogénesis la vía principal de diseminación tumoral. En cuanto al espesor tumoral, parece relacionarse con estos mecanismos neoformativos de modo que los tumores con espesor de más de 2 mm. muestran un mayor crecimiento activo de vasos linfáticos en el interior de su estroma.

Los resultados obtenidos muestran a su vez una correlación entre la linfangiogénesis y la infiltración linfoplasmocitaria. Es probable que las células inflamatorias crónicas (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas) jueguen un papel activo en el desarrollo de la linfangiogénesis intratumoral. En un estudio previo de *Liu y cols* sobre carcinomas intraorales, se relaciona a la población de macrófagos del estroma tumoral con la vascularización tumoral y con una

peor supervivencia (una población elevada de macrófagos en el estroma tumoral se asocia con una peor tasa de supervivencia), por lo que el microambiente tumoral puede intervenir en los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis y, por tanto, en el pronóstico.<sup>210</sup>

Como resumen, se identifica una neoformación activa de vasos linfáticos en el interior del estroma tumoral en los casos estudiados. En el CEI, la linfangiogénesis se asocia con un peor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en los pacientes con estadios precoces (Grupo I). El estudio de la vascularización linfática intratumoral mediante técnicas de inmunohistoquímica con el marcador PA2.26/podoplanina en muestras de pacientes, sobretudo en aquellos casos precoces con cuellos clínicamente negativos, puede contribuir en la decisión de realizar una disección electiva en los casos positivos, dado que este tratamiento mejora la supervivencia de los pacientes. Este estudio puede además contribuir en la selección de los pacientes que se beneficiarían de tratamientos complementarios más agresivos como radioterapia y/o quimioterapia adyuvante para disminuir el riesgo de recidivas. El mejor conocimiento de estos factores puede además impulsar el desarrollo futuro de drogas anti-linfangiogénicas que frenen los procesos de diseminación linfática y, por tanto, las metástasis.<sup>211</sup>

### **6.3. POLIMORFISMOS DE HIF-1 $\alpha$**

El factor inducido por hipoxia o HIF-1 $\alpha$  es un factor de transcripción que juega un papel fundamental en aquellos procesos biológicos que tienen lugar

en condiciones de hipoxia como la angiogénesis y la carcinogénesis. En la mayoría de los carcinomas, la sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$  se correlaciona con un aumento de la mortalidad y una peor respuesta al tratamiento.<sup>174</sup> Esto se ha descrito en tumores como el carcinoma de mama, cérvix uterino, ovario, endometrio o el cáncer gástrico.<sup>172,212-215</sup> Sin embargo, los datos existente sobre la influencia de este factor en los carcinomas de cabeza y cuello resultan contradictorios. Estudios *in vitro* sobre líneas celulares de cáncer oral encuentran una asociación entre la sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$  y un aumento de la invasividad celular.<sup>216</sup> En diversos estudios clínicos, se demuestra que la expresión de HIF-1 $\alpha$  está correlacionada con un peor pronóstico de supervivencia y una peor respuesta a los tratamientos.<sup>89,177,210,217</sup> Por el contrario, otros autores muestran una asociación positiva entre la sobre-expresión de este factor y un buen pronóstico.<sup>173,218</sup> Todo ello hace pensar que los mecanismos de expresión de HIF-1 $\alpha$  en el cáncer oral y de cabeza y cuello son más complejos de lo que hoy en día se conoce y que deben existir otros factores que determinen las acciones de este factor.

En el presente estudio se analizan dos polimorfismos de HIF-1 $\alpha$  descritos en el exón 12 consistentes en la sustitución de una C por una T en la posición 1772, resultando en el cambio de una prolina en la posición 582 por una serina y de una G por una A en la posición 1790 del gen para este factor, teniendo como consecuencia el cambio de una alanina en la posición 588 por una treonina. Estos polimorfismos alrededor del dominio ODDD son importantes para la regulación dependiente de oxígeno de la proteína HIF-1 $\alpha$  mediante la hidroxilación por prolin hidroxilasas del residuo prolina 564 (P564).<sup>180</sup> Estos

cambios parecen resultar en un aumento de los niveles de HIF-1 $\alpha$  en carcinomas de diferentes localizaciones en situación tanto de hipoxia como normoxia.<sup>88,181,198</sup> La significación pronóstica de estos dos polimorfismos ha sido escasamente estudiada hasta la fecha en los carcinomas de cabeza y cuello.

En el presente estudio se analiza la distribución por frecuencias de estos dos polimorfismos en un grupo de pacientes de la serie de CEI en estadios precoces y en una muestra de voluntarios sanos. En relación con el polimorfismo C1772T, no se encuentran diferencias significativas entre el grupo de pacientes y la población sana, incluso agrupando homocigotos y heterocigotos para la variante polimórfica T. Respecto al polimorfismo G1790A, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa de modo que la variante alélica A es más frecuente en los pacientes con CEI (38,1%) respecto a los voluntarios sanos (6,5%). El riesgo (OR) de padecer un carcinoma es 9,5 veces mayor si se es portador del alelo A frente aquellos con el genotipo GG. El análisis se realiza teniendo en cuenta la presencia de alelo A y no por genotipos debido a la baja frecuencia de homocigotos AA (4,8% en el grupo de pacientes) si existir ningún voluntario sano homocigoto para la variante polimórfica. Estas diferencias entre pacientes y población sana también han sido descritas en otros tipos tumorales como en el estudio de *Ollerenshaw y cols* en el carcinoma renal, en el cual se describe una mayor frecuencia del polimorfismo G1790A en pacientes frente a voluntarios sanos, lo cual sugiere que este polimorfismo debe conferir una susceptibilidad para sufrir determinados tipos de carcinomas.<sup>180</sup> En este trabajo *Ollerenshaw y cols* se

encuentra una mayor frecuencia del genotipo TT en los pacientes frente a los controles aunque la presencia del alelo T no resulta en diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, *Konac y cols*<sup>192</sup> encuentran diferencias en las distribuciones genotípicas del polimorfismo C1772T en pacientes con carcinomas de cérvix y endometrio frente a la población sana pero no en el polimorfismo G1790A, al igual que *Chau y cols*<sup>194</sup> en adenocarcinomas de próstata para este mismo polimorfismo. Por último, en un metaanálisis reciente publicado sobre susceptibilidad al cáncer y HIF-1 $\alpha$ , tras analizar los diversos estudios publicados en la literatura se concluye que C1772T confiere una predisposición al cáncer.<sup>219</sup> Aunque este estudio no parece mostrar evidencia de asociación entre G1790A y un incremento del riesgo de cáncer, si podría existir cierta influencia en algunos tipos de carcinomas.<sup>219</sup>

En cuanto la significación pronóstica de estos dos polimorfismos, en el presente estudio se objetiva una asociación entre G1790A y el periodo libre de enfermedad de modo que los pacientes portadores del alelo A muestran una mayor tendencia a las recidivas loco-regionales que los pacientes con genotipo G/G (48% para los portadores del alelo A frente a un 21,1% para el genotipo G/G). Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas para el polimorfismo C1772T y el periodo libre de enfermedad así como para ambos polimorfismos con la supervivencia causa-específica. Recientemente, nuestro grupo ha publicado los primeros resultados que demuestran la importancia del polimorfismo G1790A como factor pronóstico en el CEI.<sup>220</sup> Otro estudio en proceso de realización por nuestro grupo en carcinomas de cuerda vocal T1-

T2N0, se observa esta asociación significativa entre el polimorfismo G1790A y el desarrollo de metástasis linfáticas ganglionares (datos no disponibles). *Tanimoto y cols* objetivan un aumento de número de microvasos sanguíneos en carcinomas de cabeza y cuello en aquellos casos heterocigotos para ambos polimorfismos C1772T y G1790A de forma significativa ( $p<0,01$ ) así como mayor frecuencia de portadores del alelo mutado en tumores T2-T4 respecto a T1, pero no encuentran una asociación con la supervivencia.<sup>88</sup> Sin embargo, *Herbert y cols* no encuentran una correlación entre estos polimorfismos y el tamaño o el estadio tumoral en su serie de carcinomas de cabeza y cuello.<sup>181</sup> Esta falta de correlación entre polimorfismos y tamaño tumoral se corresponde con los resultados obtenidos en este estudio. Probablemente esto sugiere que el pronóstico en el CEI se ve influenciado principalmente por la agresividad intrínseca tumoral y no por tamaño tumoral. En otros modelos tumorales si se encuentran resultados interesantes al respecto, como en la serie de *Ling y cols* de carcinomas esofágicos donde se observa una asociación entre el polimorfismo C1772T de HIF-1 $\alpha$  y el tamaño tumoral así como un mayor índice de metástasis linfáticas.<sup>193</sup> No obstante, en dicho estudio no demuestran una asociación entre el tamaño tumoral y G1790A. Otros trabajos publicados no demuestran la implicación pronóstica de los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ .<sup>192,221</sup>

Al estudiar la asociación de ambos polimorfismos con la linfangiogénesis, se observa una ausencia de asociación entre esta y HIF-1 $\alpha$ . Probablemente esto se deba a que son otros factores sin influencia directa HIF-1 $\alpha$  los que intervienen en la neoformación linfática. La linfangiogénesis puede ser una

consecuencia de la sobre-expresión de estos factores, siendo más dudosa la influencia de HIF-1 $\alpha$ .

Respecto a otros factores clínico-patológicos, no se encuentra ninguna relación entre estos y el polimorfismo G1790A. En cuanto a C1772T, se observa una ligera predominancia de este polimorfismo en el sexo femenino en los pacientes de la serie. Este dato sugiere la susceptibilidad en las mujeres portadoras del polimorfismo C1772T al cáncer descrita por *Zhao y cols* en su metaanálisis.<sup>219</sup> Por otro lado, se observa en esta serie una mayor frecuencia del alelo mutado T en tumores con alto índice mitótico mientras que este alelo sólo se detecta en aquellos tumores con escaso o moderado polimorfismo nuclear. Aunque estos resultados son en cierto modo contradictorios si parece que el polimorfismo de C1772T puede estar relacionado con la agresividad tumoral al relacionarse con un mayor número de mitosis celular. Estudios más amplios podrán esclarecer estos datos.

Como resumen, según los resultados de este estudio, el polimorfismo G1790A de HIF-1 $\alpha$  parece estar relacionado con una cierta predisposición al CEI y parece influir de forma significativa en las recidivas de estos pacientes. El conocimiento de HIF-1 $\alpha$  parece ser además un factor relevante para la toma de decisiones en el algoritmo terapéutico del CEI, ya que se pueden conocer aquellos pacientes de riesgo con posible peor curso evolutivo en los que se debe ser más agresivo en los tratamientos tanto del tumor primario como con las terapias adyuvantes postoperatorias (quimioterapia y/o radioterapia) para prevenir estas posibles recidivas. Así mismo, el factor HIF-1 $\alpha$  puede servir en el

reconocimiento de los tumores con mayor resistencia a la hipoxia y, por tanto con una mayor predisposición al fracaso de los tratamientos de quimio-radioterapia.<sup>89</sup> El desarrollo de drogas inhibidoras de HIF-1 $\alpha$ , como YC-1, 2-metoxiestradiol o rapamicina y geldamicina, parece ser el futuro de las nuevas terapias citotóxicas, aunque se necesitan todavía muchos estudios para demostrar su efectividad.<sup>176</sup>

#### **6.4. SEGUNDAS NEOPLASIAS**

La presencia de segundas neoplasias es un evento frecuente descrito en los pacientes con carcinomas de cabeza y cuello.<sup>222</sup> Preferentemente se trata de carcinomas epidermoides localizados en el tracto aerodigestivo superior.<sup>222,223</sup> La tasa de segundas neoplasias en la serie global del presente estudio es de un 21%, siendo la localización más frecuente la cavidad oral con un 35,7%, lo que concuerda con estos datos de la literatura. Se sugiere la teoría del campo de cancerización de modo que los mismos agentes carcinogénicos actuarían en la aparición de estos tumores múltiples alterando o bien una población monoclonal celular que se extendería por toda la mucosa o grupos celulares independientes que darían lugar a estas múltiples lesiones.<sup>222,223</sup> Sin embargo, la presencia de segundos tumores en otras localizaciones como el pulmón, el esófago o la próstata, sugiere una predisposición genética en estos pacientes para sufrir múltiples neoplasias.

Los criterios empleados para definir una segunda neoplasia son los clásicos de Warren y Gates.<sup>199</sup> Para este estudio de tumores intraorales se han



modificado dichos criterios ya que en cavidad oral y orofaringe la mayoría de los tumores son carcinomas epidermoides y es difícil que se cumpla el criterio de diferente histología definido según estos autores. Además, como se ha visto con anterioridad, el grado de diferenciación histológica es un criterio sujeto a subjetividad por lo que tampoco se puede utilizar para diferenciar entre carcinomas epidermoides. Se ha introducido para diferenciar entre segundas neoplasias y recidivas el criterio temporal de 5 años, ya que como se ha visto la mayoría de las recidivas aparecen en los 3 primeros años, por lo que a partir del quinto año puede considerarse como un segundo tumor si la localización intraoral no es la misma que la del primario o es contralateral. Otro criterio que se establece es que el tumor primario sea N0 para que se descarte la enfermedad diseminada, criterio que cumplen todos los casos de la serie.

En este estudio se analiza la asociación entre la presencia de segundas neoplasias y diferentes variables clínico-patológicas así como con la linfangiogénesis y los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ . En el análisis realizado no se ha encontrado una asociación entre la linfangiogénesis intratumoral y la presencia de segundas neoplasias. Esto tiene especial relevancia cuando se trata de segundos tumores de localización intraoral en los que cabe pensar que actúan los mismos factores etio-patológicos que en el tumor primario, y por tanto los mismos factores linfangiogénicos. Sin embargo, esta ausencia de relación refuerza la teoría de grupos de células tumorales independientes como origen de estas lesiones, en los cuales no actúan los mismos factores linfangiogénicos y son otros factores no bien conocidos los que estimulan la aparición de múltiples tumores. En diversos estudios en la literatura se asocia

la presencia de estas segundas neoplasias con factores clásicos como el tabaco o el alcohol, con efectos acumulativos aunque se cese el hábito.<sup>222,224,225</sup> Por el contrario y en concordancia con otros autores,<sup>223,226</sup> en este análisis no se ha identificado ninguna asociación entre las segundas neoplasias y los diferentes factores de riesgo, por lo que no existe un claro consenso en cuanto a estos factores de riesgo para segundas neoplasias.

En relación con los polimorfismos de HIF-1 $\alpha$ , no se ha encontrado una relación entre estos y la presencia de segundas neoplasias. Esto hace pensar en la teoría del campo de cancerización y en un menor influjo de las alteraciones de expresión o función de HIF-1 $\alpha$ , sobretudo en las lesiones intraorales.<sup>222,223</sup> No obstante, un porcentaje no desdeñable de pacientes de este grupo de segundas neoplasias presentan el alelo polimórfico A (50% de los pacientes de este grupo con G1790A analizado), por lo que es posible que estos polimorfismos si confieran cierta susceptibilidad genética para tener múltiples neoplasias.

En cuanto al pronóstico de estos pacientes, en este estudio se observa una tendencia a presentar mayor tasa de recurrencias del tumor primario, 42,3% de recidivas en los pacientes con segundos tumores primarios frente a un 22,4% para los pacientes sin segundas neoplasias ( $p=0,04$ ). Esto sugiere que en estos pacientes los tumores son probablemente más agresivos y, por tanto con peor supervivencia. Al considerar la mortalidad por causa tumoral en estos pacientes, se observa una diferencia significativa de modo que en el grupo de segundas neoplasias la supervivencia a 5 años es de un 78,9% frente

a un 92,4% en el grupo sin segundos tumores ( $p<0,01$ ). Otros autores demuestran esta mayor agresividad y una reducción de la supervivencia en los casos de múltiples neoplasias.<sup>222</sup>

Por lo tanto, los pacientes con antecedentes de carcinomas epidermoides de cabeza y cuello deben ser sometidos a un seguimiento estrecho y prolongado ante el riesgo de segundas neoplasias, como aquellos con antecedentes de tumores malignos previos que desarrollen un CEI para detectar de manera precoz las posibles recidivas. El mejor conocimiento de los factores que confieren susceptibilidad para desarrollar múltiples tumores puede contribuir a seleccionar a los pacientes que precisarían de seguimientos estrechos y terapias más agresivas.



## **CONCLUSIONES**



**1-** En la serie de carcinomas epidermoides analizada se han identificado vasos linfáticos iniciales PA2.26 positivos con signos de neoformación activa lo que indica la presencia de *linfangiogénesis intratumoral*. Esta *linfangiogénesis* se asocia con un peor pronóstico de supervivencia libre de enfermedad en los estadios precoces del CEI que han sido tratados mediante disección cervical como tratamiento primario de los ganglios linfáticos cervicales.

**2-** En este estudio, el *polimorfismo G1790A de HIF-1 $\alpha$*  parece conferir una susceptibilidad genética para el carcinoma epidermoide de cavidad oral y orofaringe. *G1790A* se asocia con un mayor riesgo de recidivas loco-regionales en el grupo de pacientes con CEI en estadios precoces, mientras que el *polimorfismo C1772T* parece conferir cierta susceptibilidad para padecer un CEI en el grupo de mujeres.

**3-** La *linfangiogénesis intratumoral* y los *polimorfismos de HIF-1 $\alpha$*  no intervienen en la aparición de segundas neoplasias. Los pacientes con múltiples tumores presentan un peor pronóstico de supervivencia, ya que muestran mayores tasas de mortalidad por causa tumoral y un mayor índice de recidivas del tumor intraoral primario a estudio.





## **BIBLIOGRAFÍA**



- 1-Zavras AI, Laskaris C, Kittas C, Laskaris G.** Leukoplakia and intraoral malignancies: female cases increase in Greece. *JEADV* 2003;17: 25-7.
- 2-Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V.** Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000;36: 170-4.
- 3-Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sørensen FB, Søgaard H, Nielsen JE.** Histopathologic, stereologic, epidemiologic and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 1996;18:142-52.
- 4- Naval L, Rodríguez FJ, Díaz F, Rubio P, Muñoz M, Sastre J.** Analysis of the outcome of surgical treatment for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. 1st World Congress on Head and Neck Oncology. Madrid 1998:1385-93.
- 5-Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG.** Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein level in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000;18: 2046-52.
- 6-Chen PH, Ko YC, Yang YH, Lin YC, Shieh TY, Chen CH, Tsai CC.** Important prognostic factors of long-term oropharyngeal carcinoma survivors in Taiwan. *Oral Oncol* 2004;40:874-55.
- 7-Nieto A, Ruiz-Ramos M.** Rising trends in oral cancer mortality in Spain, 1975-94. *J Oral Pathol Med* 2002;31:147-52.
- 8-García Marín F, Garcia-Rozado A, Cebrián JL, Monje F.** Protocolos clínicos de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. Ed GlaxoSmithKline.
- 9-Sarkaria JN, Harari PM.** Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rational for aggressive therapy. *Head Neck* 1994;16:107-11.
- 10-Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS.** Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people- a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37:401-18.
- 11- Martín-Granizo R, Rodríguez-Campo F, Naval L, Díaz-González FJ.** Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40. *Otolaryngol Head neck Surg* 1997;117:268-75.
- 12- Pitman KT, Jonson JT, Wagner RL, Myers EN.** Cancer of the tongue in patients less than forty. *Head Neck* 2000;22:297-302.
- 13- Bhattacharyya N.** A matched survival analysis for squamous cell carcinoma of the head and neck in the elderly. *Laryngoscope* 2003;113: 368-72.
- 14- Wüncsh-Filho V.** The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncology* 2002;38:737-46.

- 15- **Franco EL, Dib LL, Pinto DS, Lombardo V, Contesini H.** Race and gender influences on the survival of patients with mouth cancers. *J Clin Epidemiol* 1993;46:37-46.
- 16- **Güneri P, Çankaya H, Yavuzer A, Güneri EA, Erişen L, Özkul D, El SN, Karakaya S, Arican A, Boyacıoğlu H.** Primary oral cancer in a Turkish population sample: association with sociodemographic features, smoking, alcohol diet and dentition. *Oral Oncol* 2005;41:1005-12.
- 17- **Amaral TMP, da Silva AR, Lopes A, Lopes CA, Kowalski LP.** Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncology* 2004;40:780-6.
- 18- **Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C.** Risk factors for oral and pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol* 1999;35:375-8.
- 19- **Khan FA, Robinson PG, Warnakulasuriya KAAS, Newton JT, Gelbier S, Gibbons DE.** Predictors of tobacco and alcohol consumption and their relevance to oral cancer control amongst people from minority ethnic communities in the South Thames health region, England. *J Oral Pathol Med* 2000;29: 214-9.
- 20- **Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, Dokianakis G, Segas J, Lefantzis D, Nomikos P, Wang YF, Diehl SR.** Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol* 2001;37:28-35.
- 21- **Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C.** Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. *Cancer Epidemiol* 2001;10:1137-44.
- 22- **Schmidt BL, Dierks EJ, Homer L, Potter B.** Tobacco smoking history and presentation of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1055-8.
- 23- **Goldenberg D.** Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2002;38:644-9.
- 24- **Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RC.** Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:751-8.
- 25- **Thomas S, Wilson A.** A quantitative evaluation of the aetiological role of betel-quid in oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 1993;29:265-71.
- 26- **Summersgill KF, Smith EM, Kirchner HL, Haugen TH, Turek LP.** p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:334-9.
- 27- **Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM.** Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and

- normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93:586-92.
- 28- **Mao E, Smith C.** Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993; 22:12-7.
  - 29- **D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta A.** Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesion in patients from India. *J Oral Pathol Med* 1998;27:78-82.
  - 30- **Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH.** Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* 1998;108: 1098-103.
  - 31- **Sciubba JJ.** Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2:239-51.
  - 32- **Michalek AM, Mahoney MC, McLaughlin CC, Murphy D, Metzger BB.** Historical and contemporary correlates of syphilis and cancer. *Int J Epidemiol* 1994;23: 381-5.
  - 33- **Greenwood M, Thomson PJ, Lowry RJ, Steen IN.** Oral cancer: material deprivation, unemployment and risk factor behaviour- an initial study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:74-7.
  - 34- **Petridou E, Zavras AI, Lefatzis D, Dessypris N, Laskaris G, Segas J, Douglas CW, Diehl SR, Trichopoulos D.** The role of diet and specific micronutrients in the aetiology of oral carcinoma. *Cancer* 2002;94:2981-8.
  - 35- **Winn DM.** Diet and nutrition in the aetiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 1995;61:437S-45S.
  - 36- **Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M** (eds.). *AJCC (2002) Cancer Staging Manual*, 6<sup>th</sup> ed. New York: Springer, 2002.
  - 37- **Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, van der Waal I, Snow GB.** Recurrence at the primary site in head and neck cancers and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73:187-90.
  - 38- **Nithya CS, Pandey M, Naik BR, Ahamed IM.** Patterns of cervical metastasis from carcinoma of the oral tongue. *World J Surg* 2003;1:10-6.
  - 39- **Dias FL, Kligerman J, Matos G, Arcuri RA, Freitas EQ, Farias T, Matos F, Lima RA.** Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125:23-9.
  - 40- **Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauk J.** Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:142-7.
  - 41- **McMahon J, O'Brien CJ, Pathak I, Hamill R, McNeil E, Hammersley N, Gardiner S, Junor E.** Influence of

condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2003;41:224-31.

- 42- **Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau SK, Lam LK.** Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* 1992;14:359-63.
- 43- **Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, Rao B, Fornage B, Terry NH, Sample D, Hankins P, Smith TL, Wolf PJ.** Can we detect or predict the presence of occult metastases in patients with squamous cell carcinoma of the oral tongue? *Head Neck* 1998;20:138-44.
- 44- **Kaya S, Yilmaz T, Gürsel B, Saraç S, Sennaroğlu L.** The value of elective neck dissection in treatment of cancer of the tongue. *Am J Otolaryngol* 2001;22:59-64.
- 45- **Zbären P, Nuyens M, Caversaccio M, Stauffer E.** Elective neck dissection for carcinomas of the oral cavity: occult metastases, neck recurrences, and adjuvant treatment of pathologically positive necks. *Am J Surg* 2006;191:756-60.
- 46- **Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L.** Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma- does it influences in recurrence and survival? *Head Neck* 2007;29:3-11.
- 47- **Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notani K, Totsuka M, Shindoh M, Fukuda H.** Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: with respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:49-53.
- 48- **Van der Hem PS, Nauta JM, van der Wal JE, Roodenburg JLN.** The results of CO<sub>2</sub> laser surgery in patients with oral leukoplakia: a 25-year follow-up. *Oral Oncol* 2005;41:31-7.
- 49- **Van der Waal I.** Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009;45:317-23.
- 50- **Farhi D, Dupin N.** Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: fact and controversies. *Clin Dermatol* 2010;28:100-8.
- 51- **Bermejo-Fenoll A, Sanchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sanchez M.** Premalignant nature of oral lichen planus. A retrospective study of 550 oral lichen planus patients from south-eastern Spain. *Oral Oncol* 2009;45:45-56.
- 52- **Asakage T, Yokose T, Mukai K, Tsugane S, Tsubono Y, Asai M, Ebihara S.** Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. *Cancer* 1998;82:1443-8.
- 53- **Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M, Konishi N.** Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of

- the tongue. *J Oral Pathol Med* 2002;31: 227-33.
- 54- Loree TR, Strong EW.** Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 1990;106:410-4.
- 55- Jones KR, Lodge-Rigal D, Redick RL, Tudor GE, Shockley WW.** Prognostic factors in the recurrence of stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118:483-5.
- 56- Haddadin KJ, Soutar DS, Oliver RJ, Webster MH, Robertson AG, McDonald DG.** Improved survival for patients with clinically T1/T2, N0 tongue tumors undergoing a prophylactic neck dissection. *Head Neck* 1999;21:517-25.
- 57- Jacobs JR, Ahmad K, Casiano R, Schuller DE, Scott C, Laramore GE, Al-Sarraf M.** Implications of positive surgical margins. *Laryngoscope* 1993;03:64-8.
- 58- Yuen APW, Lam KY, Wei WI, Lam KY, Ho CM, Chow TL, Yuen WF.** A comparison of the prognostic significance of tumor diameter, length, width, thickness, area, volume, and clinicopathological features of oral tongue carcinomas. *Am J Surg* 2000;180:139-43.
- 59- Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T.** Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002;24: 731-6.
- 60- O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, Fisher C, Archer D, Eccles S, Rhys-Evans P.** Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncology* 2003;39:386-90.
- 61- Walburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ, Ord RA.** Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:475-84.
- 62- Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, Saito C.** Impact of lymph node metastasis on pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg* 2003;185:278-84.
- 63- Morton RP, Ferguson CM, Lambie NK, Whitlock RML.** Tumor thickness in early tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 120:717-20.
- 64- Woolgar JA, Scott J.** Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995;17:463-72.
- 65- Broders AC.** Carcinoma. Grading and practical application. *Arch Pathol* 1926;2:376-81.
- 66- Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA, Morgan PR.** The prognostic value of individual histological grading parameters in small lingual

squamous cell carcinomas. *Cancer* 1994;74:789-94.

- 67- **Nason RW, Castillo NB, Sako K, Shedd D.** Cervical node metastases in early squamous cell carcinoma of the floor of the mouth: predictive value of multiple histopathologic parameters. *World J Surg* 1990; 14:606-9.
- 68- **Yazdi I, Khalili M.** Grading of oral cancer: comparison of different systems with respect to lymph node metastasis in tongue SCC. *Arch Iranian Med* 1999;2:1-5.
- 69- **Jakobsson PA, Eneroth C, Killander D, Mobenger G, Mårtensson B.** Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phy Biol* 1973;12:1-8.
- 70- **Anneroth G, Batsakis J, Luna M.** Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95:229-49.
- 71- **Martínez-Gimeno C, Moro E, Navarro C, López V.** Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic scoring system for evaluating risk of cervical lymph node metastasis. *Laryngoscope* 1995; 105:728-33.
- 72- **Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E.** New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18:432-7.
- 73- **Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A.** Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas as high prognostic value. *J Pathol* 1992;166: 375-81.
- 74- **Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E.** Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value of oral cancer patients. *J Oral Pathol Med* 1991;20:369-72.
- 75- **Okada Y, Mataga M, Katagiri M, Ishii K.** An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:284-8.
- 76- **Close LG, Burns DK, Reisch J, Schaefer SD.** Microvascular invasion in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1987;113:1191-5.
- 77- **Kokermueller H, Brachvogel P, Eckardt a, Hausamen JE.** Neck dissection in oral cancer-clinical review and analysis of prognostic factors. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;31:608-14.
- 78- **Schliephake H.** Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer- a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32:233-245.
- 79- **Kowalski LP, Medina JE.** Metástasis ganglionares: factores predictivos. *Clin Otolaringol Noth Am* 1998;31:581-95.
- 80- **Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R.** Multivariate



predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131:472-6.

- 81- Yuen AP, Wei WI, Wong YM, Tang KC.** Elective neck dissection versus observation in the treatment of early tongue carcinomas. *Head Neck* 1997;19:583-8.
- 82- Goto M, Hasegawa Y, Tereda A, Hyodo I, Hanai N, Ijichi K, Yamada H, Fujimoto Y, Ogawa T.** Prognostic significance of late cervical metastasis and distant failure in patients with stage I and II oral tongue cancers. *Oral Oncol* 2005;41: 62-9.
- 83- Khafif Ra, Gelbfish GA, Tepper P, Attie JN.** Elective radical dissection in epidermoid cancer of the head and neck: a retrospective analysis of 853 cases of mouth, pharynx cancer. *Cancer* 1991;67:67-71.
- 84- Hannen EJM, Riediger D.** The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:2-7.
- 85- Williams JK, Carlson GW, Cohen C, Derosé PB, Hunter S, Jurkiewicz MJ.** Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity tumors. *Am J Surg* 1994;168:373-80.
- 86- Penfold CN, Partridge M, Rojas R, Langdon JD.** The role of angiogenesis in the spread of oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1996;34:37-41.
- 87- Lopez-Graniel CM, Tamez de Leon D, Meneses-Garcia A, Gomez-Ruiz C, Frias-Mendivil M, Granados-Garcia M, Barrera-Franco JL.** Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:463-8.
- 88- Tanimoto K, Yoshiga K, Eguchi H, Kaneyasu M, Ukon K, Kumazaki T, Oue N, Yasui W, Imai K, Nakachi K, Poellinger L, Nishiyama M.** Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  polymorphisms associated with enhanced transactivation capacity, implying clinical significance. *Carcinogen* 2003;24:1779-83.
- 89- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pastorek J, Karapantzios I, Gatter KC, Harris AL.** Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:67-71.
- 90- Pepper MS.** Lymphangiogenesis and tumoral metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001;7:462-8.
- 91- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Atilano K.** Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews* 2002; 2:573-83.
- 92- Beasley NJ.** Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 2002;62:1315-20.
- 93- Shah JP, Candela FC, Poddar AK.** The patterns of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1990;66:109-113.

- 94- Candela FC, Kothari K, Shah JP.** Patterns of cervical node metastases from squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Head Neck* 1990;12:197-203.
- 95- Mukherji SK, Armao D, Joshi VM.** Cervical nodal metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck: what to expect. *Head Neck* 2001;23:995-1005.
- 96- Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, Leemans CR, Shah JP, Shaha AR, Andersen PE, Kowalski LP, Pellitteri PK, Clayman GL, Rogers SN, Medina JE, Byers RM.** Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis. *Oral Oncol* 2003;39:429-35.
- 97- Byers RM, Weber RS, Andrews T, McGill D, Kare R, Wolf P.** Frequency and therapeutic implications of "skip metastases" in the neck from squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Head Neck* 1997;19:14-9.
- 98- Woolgar J.** Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral /oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:175-80.
- 99- Gamallo C, Palacios J, Suárez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A.** Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1993;142:987-93.
- 100- Chow V, Yuen APW, Lam KY, Tsao GSW, Ho WK, Wei Wl.** A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:59-63.
- 101- Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernandez-Contreras ME, Gamallo C.** P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity. An indicator of poor prognosis. *Cancer* 2005;103:960-9.
- 102- Yoshizawa M, Shingaki S, Nakajima T, Saku T.** Histopathological study of lymphatic invasion in squamous cell carcinoma (0-1N) with high potential of lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis* 1994;12:347-56.
- 103- Thomas GT, Lewis MP, Speight PM.** Matrix metalloproteinases and oral cancer. *Oral Oncol* 1999;35:221-33.
- 104- Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY.** Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinoma with regard to the metastatic potential. *Oral Oncology* 2000;36:207-13.
- 105- Myoung H, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, Lim CY, Hong SP.** Expression of membrane type I-matrix metalloproteinase in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 2002;185:201-9.
- 106- He Y, Karpanen T, Alitano K.** Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1654:3-12.

- 107- **Boardman KC, Swartz MA.** Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis. *Circ Res* 2003; 92:801-8.
- 108- **Aselli G.** De lacteibus sive lacteis venis. Quarto vasorum mesarai corum genere novo invento. Mediolani, Milano, 1627.
- 109- **Witte MH, Way DL, Witte CL, Bernas M.** Lymphangiogenesis: mechanism, significance and clinical implications. *EXS* 1997;79:65-112.
- 110- **Tammela A, Petrova TV, Alitalo K.** Molecular lymphangiogenesis: new players. *Trends Cell Biol* 2005;15: 434-41.
- 111- **Sabin FR.** On the origin and development of the lymphatic system from the veins and the develop of the lymph hearts and the thoracic duct n the pig. *Am J Anat* 1902;1:367-89.
- 112- **Huntington GS, McClure CFW.** The anatomy and development of the jugular lymph sac in the domestic cat. *Anat Rec* 1910;2:1-19.
- 113- **Kampmeier OF.** Evolution and comparative morphology of the lymphatic system. Charles C. Thomas, ed Springfield, Illinois, 1969, pp 620.
- 114- **Ali MA.** Lymphatic microvessel density and the expression of lymphangiogenic factors in oral squamous cell carcinoma. *Med Princ Pract* 2008;17:486-92.
- 115- **Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K.** Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intra-lymphatic tumor growth. *Cancer Res* 2001;61:1786-90.
- 116- **Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG.** VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001;7:186-91.
- 117- **Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M.** Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001;7:192-8.
- 118- **Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K.** Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2005;91: 125-32.
- 119- **Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breiteneker G, Kowalski H, Oberhuber G.** Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 2000;20: 2981-6.
- 120- **Kuroyama S, Kobayashi N, Ohbu M, Ohtani Y, Okayasu I, Kakita A.** Enzyme histochemical analysis of lymphatic vessels in colon carcinoma: occurrence of lymphangiogenesis within the tumor. *Hepatogastroenterology* 2005;52: 1057-61.

- 121- **Straume O, Jackson DG, Akslen LA.** Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003;9: 250-6.
- 122- **Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I.** Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastases and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2007;110:1287-94.
- 123- **Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Martin-Villar E, Quintanilla M, Gamallo C.** Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A study of early stages. *Cancer* 2004;100:553-60.
- 124- **Folkman J.** Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;26:1757-63.
- 125- **Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK.** Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000;60: 4324-7.
- 126- **Jain RK, Fenton BT.** Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *Natl Cancer Inst* 2002;94:417-21.
- 127- **Carmeliet P, Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
- 128- **Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK.** Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* 2002;296:1883-6.
- 129- **Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P.** Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail?. *Microsc Res Tech* 2001;5:61-9.
- 130- **Al-Rawi MAA, Mansel RE, Jiang WG.** Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *EJSO* 2005; 31:117-21.
- 131- **Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG.** LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999;144: 789-801.
- 132- **Wigle JT, Oliver G.** Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999;98:769-78.
- 133- **Makinen T, Jussila T, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, Alitalo K.** Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 2001;7:199-205.
- 134- **Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M.** Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999;86: 2406-12.

- 135- **Breitender-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amman G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D.** Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker of lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999;154: 385-94.
- 136- **Kriehuber E, Breitender-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D.** Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 2001;194:797-808.
- 137- **Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M.** Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005;166:913-21.
- 138- **Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Lui DD, Lee JJ, Mao L.** Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006;107: 563-9.
- 139- **Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K.** The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Res* 2005;65:550-63.
- 140- **Giorgadze TA, Zhang PJ, Pasha T, Coogan PS, Acs G, Elder DE, Xu X.** Lymphatic vessel density is significantly increased in melanoma. *J Cutan Pathol* 2004;31:672-7.
- 141- **Schemlitz M, Moll R, Kuhn C, Franke WW.** Complexus adherents, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels. *Differentiation* 1994;57:97-117.
- 142- **Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein JW, Dana MR.** Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat Med* 2004;10:13-5.
- 143- **Scholl FG, Gamallo C, Vilaró S, Quintanilla M.** Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J Cell Sci* 1999;112: 4601-13.
- 144- **Gandarillas A, Scholl FG, Benito N, Gamallo C, Quintanilla M.** Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblast, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol Carcin* 1997;20:10-8.
- 145- **Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M.** Characterization of human PA 2.26 antigen (T1 $\alpha$ -2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005;113:899-910.
- 146- **Scholl FG, Gamallo C, Quintanilla M.** Ectopic expression of PA2.26

antigen in epidermal keratinocytes leads to desestabilization of adherents junctions and malignant progression. *Lab Invest* 2000;80:1749-59.

- 147- **O-charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles SA.** Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001;92:556-68.
- 148- **Dvorak HF.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002;20:4368-80.
- 149- **Bergsland E.** Vascular endothelial growth factor as a therapeutic target in cancer. *Am J Health-Syst Pharm* 2004;61(Suppl 5):S4-11.
- 150- **McColl BK, Stacker SA, Achen MG.** Molecular regulation of the VEGF family –inducers of angiogenesis and lymphangiogenesis. *APMIS* 2004; 112:463-80.
- 151- **Stacker SA, Williams RA, Achen MG.** Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *APMIS* 2005;112:539-49.
- 152- **Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G, Matsumura T.** Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2002; 39:391-6.
- 153- **Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H.** Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;40:13-20.
- 154- **Kadambi A, Carreira CM, Yun C, Padera TP, Dolmans D, Carmeliet P, Fukumura D, Jain RK.** Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. *Cancer Res* 2001;61:2404-8.
- 155- **Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Fischer MB, Steiner GE, Hollemann D, Gedlicka C, Saaristo A, Burian M.** Vascular endothelial growth factor C and Vascular endothelial growth factor receptor 3 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Head Neck* 2003;25:464-74.
- 156- **Riedel F, Götte K, Schwalb J, Schäfer C, Hörmann K.** Vascular endothelial growth factor expression correlates with p53 mutation and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 2000;120:105-11.
- 157- **Neuchrist C, Quint C, Pammer A, Burian M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx : an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1999;119:732-8.
- 158- **Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N.** Placental growth

- factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 1994;269:25646-54.
- 159- **Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Walterberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Büttner M, Rziha HJ, Dehio C.** A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363-74.
  - 160- **Vaupel P, Mayer A, Höckel M.** Tumor hypoxia and malignant progression. *Methods Enzymol* 2004;381:335-354.
  - 161- **Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J.** Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 1996;41:31-9.
  - 162- **Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW.** Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:285-9.
  - 163- **Vanselow B, Eble MJ, Rudat V, Wollensack P, Conradt C, Dietz A.** Oxygenation of advanced head and neck cancer: prognostic marker for the response to primary radiochemotherapy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122:856-62.
  - 164- **Petersen C, Zips D, Krause M, Schöne K, Eicheler W, Hoinkis C, Thames HD, Baumann M.** Repopulation of FaDu human squamous cell carcinoma during fractionated radiotherapy correlates with reoxygenation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:483-93.
  - 165- **Hoogsteen IJ, Marres HAM, Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JHAM.** Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. A review. *Head Neck* 2007;29:591-604.
  - 166- **Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ.** Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996;379:89-91.
  - 167- **Vaupel P, Thews O, Hoeckel M.** Treatment resistance of solid tumors. *Med Oncol* 2001;18:243-59.
  - 168- **Wouters BG, Beucken van den T, Magagnin MG, Lambin P, Koumenis C.** Targeting hypoxia tolerance in cancer. *Drug Resist Updat* 2004;7:25-40.
  - 169- **Lutterbach J, Guttenberger R.** Anaemia is associated with decreased local control of surgically treated squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1345-50.
  - 170- **Prosnitz RG, Yao B, Farrell CL, Clough R, Brizel DM.** Pretreatment anaemia is correlated with the reduced effectiveness of radiation and concurrent chemotherapy in advanced head and neck cancer. *Int*

- J Radiant Oncol Biol Phys 2005;61: 1087-95.
- 171- **Pol van de S, Doornaert PAH, de Bree R, Leemans CR, Slotman BJ, Langendijk JA.** The significance of anaemia in squamous cell head and neck cancer treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Oral Oncol* 2006;42:131-38.
  - 172- **Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G.** Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is a marker for an unfavourable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6.
  - 173- **Beasley NJ, Leek R, Alam M, Turley H, Cox GJ, Gatter K, Millard P, Fuggle S, Harris AL.** Hypoxia-inducible factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. *Cancer Res* 2002; 62:2493-7.
  - 174- **Brennan PA, Mackenzie N, Quintero M.** Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2005;34:385-9.
  - 175- **Jokilehto T, Rantanen K, Luukkaa M, Heikkinen P, Grenman R, Minn H, Kronqvist P, Jaakkola PM.** Overexpression and nuclear translocation of Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase PHD2 in head and neck squamous cell carcinoma is associated with tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2006;12:1080-7.
  - 176- **O'Donnell JL, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D.** Oncological implications of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) expression. *Cancer Treatment Rev* 2006;32:407-16.
  - 177- **Roh JL, Cho KJ, Kwon GY, Ryu CH, Chang HW, Choi SH, Nam SY, Kim SY.** The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:63-8.
  - 178- **Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D.** Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-7.
  - 179- **Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF.** Regulation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  is mediated by an O<sub>2</sub> dependent domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:7987-92.
  - 180- **Ollerenshaw M, Page T, Hammonds J, Demaine A.** Polymorphisms in the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  gene (HIF1A) are associated with the renal cell carcinoma phenotype. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;153:122-6.
  - 181- **Hebert C, Norris K, Parashar P, Ord RA, Nikitakis NG, Sauk JJ.** Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  polymorphisms and TSC1/2 mutations are complementary in head and neck cancers. *Mol Cancer* 2006;5:3-14.



- 182- **Arcasoy MO, Amin K, Chou SC, Haroon ZA, Varia M, Raleigh JA.** Erythropoietin and erythropoietin receptor expresión in head and neck cancer: relationship to tumor hipoxia. Clin Cancer Res 2005;11:20-7.
- 183- **Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, Pastorek J, Cox GJ, Ratcliffe P, Harris AL.** Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis and microvessel density. Cancer Res 2001;61:5262-7.
- 184- **de Schutter H, Landuyt W, Verbeken E, Goethals L, Hermans R, Nuyts S.** The prognostic value of the hypoxia markers CA IX and GLUT I and the cytokines VEGF and IL 6 in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy ± chemotherapy. BMC Cancer 2005;5: 42.
- 185- **Eisma RJ, Spiro JD, Kreutzer DL.** Role of angiogenic factors: coexpression in interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma. Laryngoscope 1999;109:687-93.
- 186- **Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto A, Litwin S, Herlyn M.** Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head an neck. Clin Cancer Res 1999;5:775-82.
- 187- **Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A, Agnantis NJ.** Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: in vivo study. Cancer Let 2005;225:297-304.
- 188- **Stewart SA, Weinberg RA.** Telomerase and human tumorigenesis. Sem Cancer Biol 2000;10:399-406.
- 189- **Minamino T, Mitsialis SA, Kourembanas S.** Hypoxia extends the lifespan of vascular smooth muscle cells through telomerase activation. Mol Cell Biol 2001;21: 3336-42.
- 190- **Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW.** Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. Nat Med 2006: 12:1133-8.
- 191- **Kuwai T, Kitadi Y, Tanaka S, Kuroda T, Ochiumi T, Matsumura S, Oue N, Yasui W, Kaneyasu M, Tanimoto K, Nishiyama M, Chayama K.** Single nucleotide polymorphism in the hypoxia-inducible factor-1alpha gene in colorectal carcinoma. Oncol Rep 2004;12:1033-7.
- 192- **Chau CH, Permenter MG, Steinberg SM, Retter AS, Dahut WL, Price DK, Figg WD.** Polymorphismin the hypoxia-inducible factor 1α gene may confer suceptibility to androgen-independent prostate cancer. Cancer Biol Ther 2005;11:1222-5.
- 193- **Ling TS, Shi RH, Zhang GX, Zhu H, Yu LZ, Ding XF.** Common single

- nucleotide polymorphism factor-1 $\alpha$  and its impact on the clinicopathological features of esophageal squamous cell carcinoma. *Chin J Digest Dis* 2005;6: 155-8.
- 194- **Konac E, Onen HI, Metindir J, Alp E, Asyali A, Ekmekci A.** An investigation of relationships between hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphisms and ovarian, cervical and endometrial cancers. *Cancer Det Prevent* 2007;31:102-9.
  - 195- **Garnacho Montero J, Garnacho Montero MC, Ortiz Leyba C, Aldabó Pallás T.** Polimorfismos genéticos en la sepsis. *Med Intensiva* 2005;29:185-91.
  - 196- **Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC.** SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutation Research* 2003;526:53-61.
  - 197- **Carrero P, Okamoto K, Coumalleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L.** Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SCR-1 to hipoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *Mol Cell Biol* 2000;20:402-15.
  - 198- **Fransen K, Fenech M, Fredrikson M, Dabrosin C, Söderrkvist P.** Association between ulcerative growth and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  polymorphisms in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog* 2006; 45:833-40.
  - 199- **Warren S, Gates O.** Multiple primary malignant tumors. A survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer* 1932;16:1358-414.
  - 200- **Díaz González FJ.** Tratamiento integral del cancer de cavidad oral. Tesis Doctoral, Septiembre 1991.
  - 201- **Van der Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, Freeman JL, Castelijns JA, Snow GB.** The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissection. *Laryngoscope* 1996; 106:987-91.
  - 202- **Godden DRP, Ribeiro NFF, Hassanein K, Langton SG.** Recurrent neck disease in oral cancer. *J Oral Maxillofac Surg* 2002;60:748-53.
  - 203- **Capote-Moreno A, Naval L, Muñoz-Guerra MF, Sastre J, Rodriguez-Campo FJ.** Prognostic factors influencing contralateral neck lymph node metastases in oral and oropharyngeal carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2010;68:268-75.
  - 204- **Shingaki S, Suzuki I, Nakajima T, Kawasaki T.** Evaluation of histopathological parameters in predicting cervical lymph node metastasis of oral and oropharyngeal carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral* 1988;66:683-8.
  - 205- **Folkman J.** Angiogenesis and tumor growth. *N Engl J Med* 1996;334:921.
  - 206- **Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D.** Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-7.

- 207- **Van Trappen PO, Peper MS.** Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. *Lancet Oncol* 2002;3:44-52.
- 208- **Hinojar-Gutiérrez A, Fernández-Contreras E, Gonzalez-González R, Fernández-Luque MJ, Hinojar-Ardazún A, Quintanilla M, Gamallo C.** Intratumoral lymphatic vessels and VEGF-C expression are predictive factors of lymph node relapse in T1-T4 N0 laryngopharyngeal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2006;14: 248-57.
- 209- **Harrel JC, Dye WW, Allred DC, Jedlicka P, Spoelstra NS, Sartorius CA, Horwitz KB.** Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes. *Cancer Res* 2006;66: 9308-15.
- 210- **Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS.** Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008; 44:277-85.
- 211- **He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T.** Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94: 819-25.
- 212- **Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, Jakesz R, Kubista E, Birner P, Oberhuber G.** Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  is associated with an unfavourable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1831-7.
- 213- **Birner P, Schindl M, Obermair A, Breitenecker G, Oberhuber G.** Expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2001;7:1661-8.
- 214- **Sivridis E, Giatromanolaki A, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI.** Tumor and Angiogenesis Research Group. Association of hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  with activated angiogenic pathways and prognosis in patients with endometrial carcinoma. *Cancer* 2002;95:1055-63.
- 215- **Takahashi R, Tanaka S, Hiyama T, Ito M, Kitadai Y, Sumii M, Haruma K, Chayama K.** Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol Rep* 2003;10:797-802.
- 216- **Cohen NA, Lai SY, Ziober AF, Ziober BL.** Dysregulation of hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  in head and neck squamous cell carcinoma cell lines correlates with invasive potential. *Laryngoscope* 2004;114:418-23.
- 217- **Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH,**

- Semenza GL.** Expression of hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001;61:2911-6.
- 218- Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, Buerger H.** HIF-1 $\alpha$  overexpression indicates good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 2005;5:84-92.
- 219- Zhao T, Jing L, Jiangpei Z, Nzekebaloudou M.** Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *J Experiment Clin Cancer Res* 2009;28:159-69.
- 220- Muñoz-Guerra MF, Fernandez-Contreras, Moreno AL, Martin ID, Herraes B, Gamallo C.** Polymorphism in the hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  and the impact in the prognosis of early stages of oral cancer. *Ann Surg Oncol* 2009;16:2351-58.
- 221- Apaydin I, Konac E, Akbaba M, Tekin E, Ekmekci A.** Single nucleotide polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) gene in human sporadic breast cancer. *Arch Med Research* 2008; 39:338-45.
- 222- Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Manieri A.** Multiple primary tumours in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35:157-63.
- 223- van der Haring IS, Schaapveld MS, Roodenburg JLN, de Bock GH.** Second primary tumours after a squamous cell carcinoma of the oral cavity or oropharynx using the cumulative incidence method. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:332-8.
- 224- Do KA, Johnson MM, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, Khuri FR. Spitz MR.** Longitudinal study of smoking patterns in relation to the development of smoking-related secondary primary tumors in patients with upper aerodigestive tract malignancies. *Cancer* 2004;101: 2837-42.
- 225- Tomek MS, McGuirt WF.** Second head and neck cancers and tobacco usage. *Am J Otolaryngol* 2003;24:24-7.
- 226- Taussky D, Rufibach K, Huguenin P, Allal AS.** Risk factors for developing second upper aerodigestive cancer after radiotherapy with or without chemotherapy in patients with head-and-neck cancers: an exploratory outcomes analysis. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2005;62:684-9.